

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EXPOSICIÓN SECUENCIAL DE FACTORES
DE CRECIMIENTO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE
CÉLULAS TRONCALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO
CULTIVADAS EN UN SISTEMA TRIDIMENSIONAL**

POR:

M.C. ALEJANDRO GARCÍA RUIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

ASESOR: DRA. C. CELIA NOHEMÍ SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

MONTERREY, N.L., DICIEMBRE 2020

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EXPOSICIÓN SECUENCIAL DE FACTORES
DE CRECIMIENTO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE
CÉLULAS TRONCALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO
CULTIVADAS EN UN SISTEMA TRIDIMENSIONAL**

POR:

M.C. ALEJANDRO GARCÍA RUIZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

ASESOR: DRA. CELIA NOHEMÍ SÁNCHEZ DOMÍNGUEZ

MONTERREY, N.L., DICIEMBRE 2020

Análisis molecular de la exposición secuencial de factores de crecimiento sobre la diferenciación condrogénica de células troncales humanas derivadas de tejido adiposo cultivadas en un sistema tridimensional

Aprobación de la tesis:



Dra. en C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Directora de Tesis



Dra. en C. Ana María G. Rivas Estilla
Co-Directora de Tesis



Dr. en C. Carlos Córdova Fletes
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. en C. Alberto Camacho Morales
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. en C. Jorge Lara Arias
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Colaboraciones



Laboratorio de Medicina Regenerativa

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León



Laboratorio de Microbiología

Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Universidad Autónoma de Sinaloa



Departamento de Histología

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Nuevo León

Agradecimientos

A mi esposa, Irma, por impulsarme todos estos años en cada paso de este proceso, estar conmigo cuando hace falta y ayudarme cuando lo he necesitado, te lo agradezco y probablemente no habría alcanzado este nivel si no fuera gracias a ti.

A mis niños, Andrea y Román, los cuales siempre se esfuerzan por ayudarme, siempre animándome, siempre felices y sonrientes, creciendo cada vez más a mi lado y espero algún día lean esto mientras logran sus propias metas.

A mis padres Alejandro y Rosa Elena, que, aunque se encuentran lejos, siempre están presentes hace falta.

A todos los profesores que me han ayudado en mi formación, que desde la primaria hasta el posgrado se han convertido en mis amigos, y me han animado a seguir adelante. Así como a aquellos de los que he aprendido más lecciones de vida que lecciones académicas.

A mi asesora, la Dra. Celia, por acogerme y por su gran esfuerzo para que yo pueda salir adelante.

A mi comisión de tesis, la Dra. Ana María, el Dr. Alberto Camacho, el Dr. Jorge Lara y Dr. Carlos por brindar de su tiempo para mi trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, mi *alma mater*, donde he pasado 11 años de formación académica y donde espero algún día regresar.

A la Facultad de Medicina, Hospital Universitario y al Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular por el apoyo brindado para llevar a cabo mi programa de maestría y doctorado.

Al CONACYT, por su apoyo económico sin el cual esto no hubiera sido posible.

A todos aquellos que de una u otra forma han puesto de su parte y me han acompañado todos estos años, a la Dra. Gloria, Yessy, Juany, Ariadna, Don Lalo, Lulu, Hamid, Alex y todos mis compañeros a lo largo de estos años.

Tabla de contenido

Sección	Página
Lista de tablas	6
Lista de figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Capítulo I. Introducción	10
1.1 Cartílago articular	10
1.1.1 Estructura del cartílago	12
1.2 Condrocitos	13
1.2.1 Desarrollo embrionario y postnatal de los condrocitos	13
1.2.2 Interacción con el microambiente	14
1.3 Daño estructural del cartílago	17
1.3.1 Tratamiento del daño articular	18
1.4 Células troncales	21
1.4.1 Células troncales mesenquimales	23
1.4.2 Diferenciación condrogénica	25
1.5 Hipertrofia y formación de fibrocartílago	27
1.5.1 Estrategias para prevenir la hipertrofia	30
1.5.2 Factores de crecimiento y diferenciación	32
1.5.2.1 FGF2	34
1.5.2.2 IGF1	35
1.5.2.3 TGF β	35
1.5.3 Cultivo tridimensional	36
Capítulo II. Justificación	40
Capítulo III. Hipótesis	41
Capítulo IV. Objetivos	42
4.1 Objetivo general	42
4.2 Objetivos específicos	42
Capítulo V. Materiales y equipos	43
5.1 Materiales	43
5.1.1 Material de uso general	43
5.1.2 Material para cultivo celular	44
5.1.3 Material para PCR	44
5.1.4 Material para histología	45
5.2 Equipos	45
5.2.1 Equipos de uso general	45
5.2.2 Equipos para cultivo celular	45
5.2.3 Equipos para producción de andamios bifásicos	45
5.2.4 Equipos para histología	46
5.2.5 Equipos para manejo de ácidos nucleicos	46
Capítulo VI. Metodología	47
6.1 Estrategia general	47
6.2 Aislamiento de Ad-MSCs en condiciones Xeno-Free	47
6.3 Evaluación de multipotencialidad de las Ad-MSCs	50

6.4 Fabricación de andamios bifásicos	52
6.4.1 Matriz de cartílago bovino	52
6.4.2 Matriz de hueso bovino	53
6.4.3 Ensamblaje de los andamios bifásicos	54
6.5 Exposición secuencial a factores de crecimiento	55
6.5.1 Extracción de ARN	58
6.5.2 Retrotranscripción	59
6.5.3 PCR punto final	59
6.5.4 PCR cuantitativa	61
6.5.5 Análisis histológico	63
Capítulo VII. Resultados	65
7.1 Aislamiento y estandarización del cultivo celular Xeno-Free	65
7.2 Evaluación de multipotencialidad	67
7.3 Fabricación de andamios bifásicos	69
7.4 Exposición secuencial a factores de crecimiento	73
7.4.1 Evaluación de la eficiencia de los iniciadores	73
7.4.2 Evaluación microscópica de la diferenciación condrogénica	79
7.4.3 Evaluación de marcadores de diferenciación condrogénica	81
7.4.4 Evaluación de marcadores de diferenciación hipertrófica	83
7.4.5 Evaluación del marcador mesenquimal	85
7.4.6 Evaluación histológica	86
7.4.6.1 Análisis de migración	86
7.4.6.2 Análisis de la formación de matriz <i>de novo</i>	89
7.4.6.3 Análisis de formación de colágeno e hipertrofia	91
Capítulo VIII. Discusión	94
8.1 Aislamiento y estandarización del cultivo celular Xeno-Free	95
8.2 Evaluación de multipotencialidad	97
8.3 Fabricación de andamios bifásicos	98
8.4 Exposición secuencial a factores de crecimiento	100
Capítulo IX. Conclusiones	104
Capítulo X. Referencias	105
Capítulo XI. Anexos	122
Anexo I. Condiciones de cultivo celular de las líneas Ad-MSCs	122
Anexo II. Tinción histológica de Hematoxilina y Eosina (H&E)	126
Anexo III. Tinción histológica de Tricrómico de Masson	127
Capítulo XII. Apéndices	128
Apéndice I. Producción científica durante el programa de doctorado	128
Apéndice II. Curriculum	129

Lista de tablas

	Tabla	Página
Tabla 1	Diseño de iniciadores para identificación de marcadores condrogénicos, hipertróficos y mesenquimal.	60
Tabla 2	Pasos de temperatura para PCR punto final.	61
Tabla 3	Concentraciones finales de reactivos para qPCR.	62
Tabla 4	Pasos de temperatura para qPCR.	62
Tabla 5	Eficiencia de iniciadores para PCR.	78
Tabla 6	Descripción de los marcadores de diferenciación condrogénica.	82
Tabla 7	Descripción de los marcadores de diferenciación hipertrófica.	84

Lista de figuras

	Figura	Página
Figura 1	Rearreglo tridimensional de matriz de la unidad osteocondral.	11
Figura 2	Maduración condrocítica y formación de cartílago y hueso.	15
Figura 3	Factores de modulación de la actividad condrocítica.	16
Figura 4	Abordajes quirúrgicos para la restauración de cartílago.	20
Figura 5	Categorización de las células troncales.	22
Figura 6	Histología de cartílago nativo y fibrocartílago.	28
Figura 7	Hipertrofia y recambio de matriz celular.	29
Figura 8	Proceso de diferenciación e hipertrofia <i>in vitro</i>.	33
Figura 9	Componentes propuestos para la restauración de cartílago.	39
Figura 10	Estrategia general del proyecto.	47
Figura 11	Esquemas de exposición a factores de crecimiento.	56
Figura 12	Cultivo primario de Ad-MSCs (3 Días).	65
Figura 13	Morfología y proliferación celular del cultivo primario de Ad-MSCs.	66
Figura 14	Inmunofluorescencia de factores SSEA4, NANOG, OCT3/4 y SOX2.	68
Figura 15	Descelularización de matriz de hueso bovino.	70
Figura 16	Porcentajes de descelularización.	71
Figura 17	Matriz de cartílago y hueso bovino descelularizados.	71
Figura 18	Andamio bifásico osteocondral ensamblado.	72
Figura 19	Electroforesis del RNA total aislado y retrotranscripción a ADNc.	74
Figura 20	PCR punto final con iniciadores diseñados.	75
Figura 21	qPCR para determinación de eficiencia de iniciadores diseñados.	76
Figura 22	Gráfico de eficiencia de amplificación.	77
Figura 23	Cultivo celular con y sin factor FGF2.	79
Figura 24	Ad-MSCs expuestas a medio de diferenciación.	80
Figura 25	Análisis de expresión de marcadores de diferenciación condrogénica.	81
Figura 26	Análisis de expresión de marcadores de diferenciación hipertrófica.	83
Figura 27	Análisis de expresión del marcador mesenquimal CD90.	85
Figura 28	Análisis de migración celular dentro del andamio bifásico.	87
Figura 29	Análisis de migración dentro de fase condral.	88
Figura 30	Generación y recambio de matriz extracelular (H&E).	90
Figura 31	Generación y recambio de matriz extracelular (Tricrómico de Masson).	92

Abreviaturas

Abreviatura	Nombre	Abreviatura	Nombre
%	Porcentaje	m	Pendiente
°C	Grados Celsius	MEC	Matriz extracelular
µg	Microgramos	min	Minutos
µL	Microlitros	mL	Mililitros
µM	Micro molar	mM	Milimolar
µm	Micrómetros	mm	Milímetros
3D	Tridimensional	mod	Modelo
Ad-MSc	Células mesenquimales derivadas de tejido adiposo	MSC	Células mesenquimales
ADN	Acido desoxirribonucleico	ng	Nanogramos
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	nM	Nano molar
ARN	Ácido ribonucleico	Xeno-Free	Libre de componentes de origen exógeno
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	Log	Logaritmo
ATMP	Terapia medicinal avanzada	pb	Pares de bases
BH	Buffer hipotónico	PBS	Solución salina de fosfatos
CB	Buffer de citoesqueleto	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
xg	Gravedades	PCR PF	Reacción en cadena de la polimerasa, punto final
cm ²	Centímetros cuadrados	pH	Potencial de hidrogeno
Ct	Umbral de cuantificación	PTFE	Politetrafluoroetileno
FC	Factores de crecimiento	qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa, cuantitativa
g	Gramos	RT	Retrotranscripción.
h	Horas	s	Segundos
H&E	Hematoxilina y Eosina	SBF	Suero bovino fetal
HFIP	Hexa fluoro isopropanol	SH	Suero humano
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica	TIF	Tipo inspección federal
iPSC	Células troncales pluripotentes inducidas	V	Volts
ISCT	Sociedad internacional para terapia celular	kPa	Kilopascales

Resumen

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA EXPOSICIÓN SECUENCIAL DE FACTORES DE CRECIMIENTO SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CONDRÓGENICA DE CÉLULAS TRONCALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO CULTIVADAS EN UN SISTEMA TRIDIMENSIONAL

Nombre: M.C. Alejandro García Ruiz.

Institución: Universidad Autónoma de Nuevo León.

Localización: Monterrey, Nuevo León, México.

Número de páginas: 132.

Introducción: El cartílago articular recubre las extremidades de los huesos largos, provee protección a las uniones articulares y se forma a partir de la matriz secretada por los condrocitos. Las lesiones del cartílago afectan del 10% al 12% de la población, ocasionando como principal síntoma dolor y pérdida de movilidad de las articulaciones afectadas. Ante la baja capacidad de regeneración del cartílago articular, se propone el uso de células mesenquimales, diferenciadas a condrocitos, para lograr su restauración. Las células mesenquimales poseen capacidad de diferenciación en condiciones específicas de cultivo. Sin embargo, no existe actualmente un procedimiento que logre mantener una diferenciación hacia condrocitos estables, con correcta secreción de matriz extracelular, ya que las células diferenciadas progresan hacia un estado hipertrófico en el que secretan factores de degradación y calcificación de la matriz extracelular. En este proyecto proponemos el uso de factores de crecimiento, en esquemas de exposición y en un soporte osteocondral, con el fin de alcanzar la estabilidad de los condrocitos generados a partir de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs).

Objetivo: Efectuar la exposición secuencial de factores de crecimiento sobre la diferenciación condrogénica de células troncales humanas derivadas de tejido adiposo, cultivadas en un sistema tridimensional y comprobar el grado de mantenimiento de sus características condrogénicas.

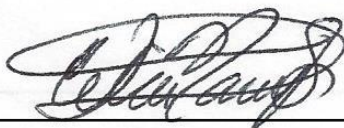
Metodología: Se realizó el aislamiento de Ad-MSCs y se evaluó la expresión de los marcadores de multipotencia *SOX2*, *NANOG*, *OCT3/4*, y *SSEA4*. Se realizó la fabricación de andamios bifásicos osteocondrales a partir de matriz de cartílago, fibroína de seda y matriz de hueso, para generar un sistema de soporte tridimensional el cual simule el microambiente condrocítico. Las Ad-MSCs fueron expuestas a diferentes esquemas de diferenciación condrogénica mediante factores de crecimiento y se realizó la evaluación de sus marcadores condrogénicos, hipertróficos y mesenquimales mediante qPCR e histología durante los periodos analizados, determinando el esquema con mejor potencial de diferenciación estable.

Resultados: Se realizó el aislamiento Ad-MSCs bajo condiciones xeno-free, las cuales presentan características mesenquimales. Las células expandidas exhibieron los marcadores de multipotencialidad esperados para células troncales adultas (*NANOG*, *OCT3/4* y *SOX2*).

Después de su exposición a los esquemas de diferenciación en los andamios bifásicos tridimensionales, todos los grupos presentaron la expresión tanto de marcadores condrogénicos como osteogénicos, sin embargo, el uso de FGF2 (10 ng/ml) seguido de una combinación de IGF1 (100 ng/ml) y TGF- β 1 (10 ng/ml) y mantenimiento en TGF- β 1 (10ng/ml) mostraron la mejor firma de diferenciación condrogénica y el menor nivel de expresión hipertrófica, manteniendo una deposición estable de la matriz extracelular hasta el día 33.

Conclusiones: Se logró realizar el aislamiento de Ad-MSCs, las cuales mantienen su característica multipotente en los pasajes utilizados, y se consiguió establecer un esquema de exposición el cual promueve una diferenciación estable de Ad-MSCs a condrocitos mediante el uso de factores de crecimiento, combinado con un sistema de soporte tridimensional el cual recrea el microambiente condrocítico, ralentizando el proceso de progresión hipertrófica, con un posible uso clínico en lesiones de cartílago.

FIRMA DEL ASESOR:



Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez

Introducción

1.1 Cartílago Articular.

El cartílago articular es un tipo de tejido conectivo aneural, avascular y alinfático de entre 1mm y 4mm de espesor el cual se encuentra recubriendo las extremidades de los huesos largos y provee de resistencia mecánica a la compresión y a la fricción entre los mismos, protegiendo de esta forma las uniones articulares (1). Este tipo de cartílago hialino provee una superficie suave, lisa y lubricada que ayuda a reducir la fricción y la carga mecánica sobre el hueso subcondral, gracias a sus características de elasticidad y flexibilidad (2).

El tejido de cartílago se encuentra anclado al hueso subcondral, formando una unidad osteocondral subdividida en regiones específicas, con morfología celular, rearreglo tridimensional y componentes proteicos dependientes de la zona del cartílago articular. La región de hueso se une al cartílago a través de una fase de cartílago calcificado y depletado en proteoglicanos, mientras que la zona de cartílago se subdivide a su vez en 3 zonas:

- **zona superficial:** En esta región las células se encuentran en forma elongada con un arreglo de forma tangencial a la superficie del cartílago y consta de una capa fina de fibras de colágeno tipo II.
- **zona intermedia:** Zona central, donde las células se encuentran de forma redondeada u ovoide, con una distribución al azar, y la matriz consta de una mayor cantidad de proteoglicanos.

- **Zona profunda:** En contacto con el hueso subcondral, las células se encuentran de forma redondeada y acomodadas a modo de columnas cortas.

Cada una de estas zonas posee una densidad celular, organización y matriz extracelular (MEC) diferentes, creando así una matriz tridimensional compleja difícil de simular *in vitro*, la cual en conjunto con el hueso subcondral se le conoce como unidad osteocondral (2,3) (Figura 1).

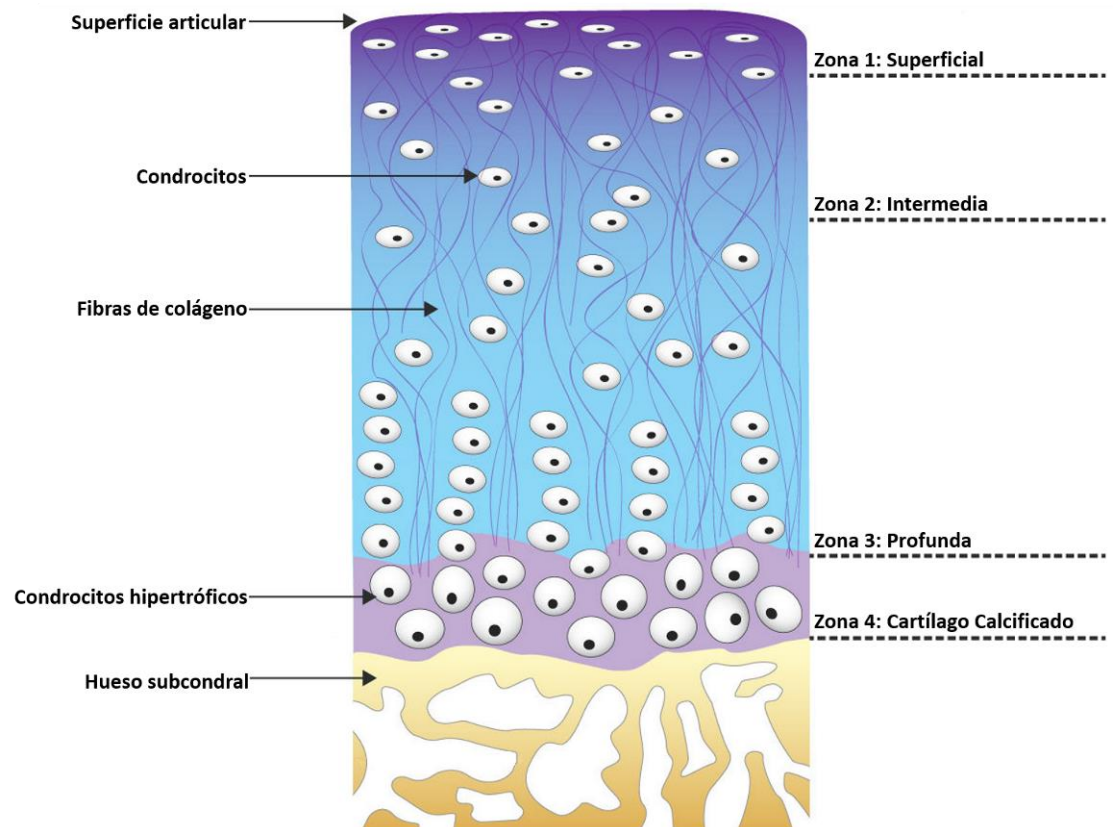


Figura 1. Rearreglo tridimensional de matriz de la unidad osteocondral. Modificado de Gadjanski *et al.* 2015 (107)

1.1.1 Estructura del cartílago.

El cartílago articular se encuentra formado a partir de la matriz extracelular secretada por los condrocitos, y se encuentra compuesto de múltiples proteínas que aportan las propiedades mecánicas propias de este tejido.

- Colágeno: Representa aproximadamente el 60% del peso seco del cartílago y aporta la fuerza de resistencia mecánica a la compresión, del cual el colágeno tipo II se encuentra en una mayor proporción, con hasta un 80% de los componentes colágenos del cartílago (4). El colágeno tipo II es usado como uno de los principales marcadores histológicos de este tipo de tejido. Existiendo además la presencia de colágenos tipo I, IV, VI, IX, X, XI, XII y XIII los cuales participan en menor cantidad durante las diferentes etapas de maduración del cartílago articular y aportan parte de las propiedades mecánicas, organización interna y forma del cartílago articular (3).**
- Proteoglicanos: Componen entre el 5% y 12% del cartílago articular (4), se encuentran formados de glicosaminoglicanos sulfatados, como el condroitín sulfato y el queratán sulfato, los cuales se unen al ácido hialurónico mediante proteínas de enlace. Los proteoglicanos forman moléculas de gran extensión que permiten una alta retención de moléculas de agua, la cual forma del 65% al 80% del volumen total del cartílago, aportando sus características de flexibilidad y viscoelasticidad (4,5).**
- Proteínas no colágenas: permiten el anclaje de los condrocitos al sustrato de cartílago mediante su unión a los receptores de membrana. Estas proteínas forman una red de señalización molecular que permite a los condrocitos detectar los cambios en su microambiente, regulando de esta forma su migración, proliferación y diferenciación, como lo son las integrinas y la fibronectina (6,7).**

1.2 Condrocitos.

Los condrocitos son células derivadas del mesénquima y son considerados la única línea celular presente en el cartílago hialino articular, siendo los responsables de la secreción de matriz extracelular que conforma este tejido (8).

Los condrocitos conforman tan solo el 2% del volumen total del cartílago articular y varían de entre 5µm a 15µm de diámetro. Poseen un sistema altamente desarrollado de gránulos secretorios y una elevada actividad biosintética durante su etapa de maduración, la cual disminuye una vez alcanzada su madurez. En su estadio maduro, los condrocitos suspenden su división celular y se mantienen agrupados en lagunas rodeadas de matriz extracelular, creando un ambiente anóxico responsable del metabolismo anaerobio propio de los condrocitos (8,9).

1.2.1 Desarrollo embrionario y postnatal de los condrocitos.

El rastreo del linaje celular de los condrocitos permite determinar su origen y morfogénesis en el tejido articular durante el desarrollo embrionario y postnatal, permitiendo determinar el origen heterogéneo del tejido articular.

Las células pre-condrocíticas, provenientes del mesénquima, comienzan con un proceso de condensamiento celular, el cual inicia desde la etapa embrionaria, acompañado de la expresión de moléculas involucradas en la adhesión célula-célula, como N-cadherina (10). Este proceso se lleva a cabo en los extremos articulares de los huesos largos, mediante la expresión de los factores de transcripción SOX9 y GDF5, iniciando con la formación de un tejido de cartílago delgado y escaso en matriz extracelular.

Una vez en la etapa postnatal el volumen interno de los condrocitos se incrementa y comienza el periodo de producción de matriz extracelular, generando una abundante cantidad de colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas. La secreción de matriz extracelular tiene como consecuencia el crecimiento y remodelación del tejido de cartílago hacia sus diferentes zonas articulares y hueso subcondral(11).

Una vez que el tejido de cartílago alcanza su madurez, adquiere características avasculares, aneurales y alifáticas, lo que reduce su densidad celular y capacidad de regeneración. Este proceso limita los procesos de reparación o regeneración del tejido (11).

El lograr descifrar los mecanismos moleculares responsables de guiar el proceso de generación y maduración del cartílago articular, así como de los componentes que manipulan el proceso condrogénico y formación de matriz extracelular, son necesarios para determinar una posible estrategia de regeneración del cartílago articular.

1.2.2 Interacción con el microambiente

El proceso de condrogénesis se encuentra regulado por un complejo de interacciones célula-célula y célula-matriz, así como por una gran cantidad de moléculas solubles de señalización celular (factores de crecimiento y diferenciación). Estos factores permiten el desarrollo, maduración y homeostasis del cartílago articular, y constan de moléculas de señalización como proteínas de la familia del factor de crecimiento transformante beta ($TGF\beta$), proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) y factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs), los cuales activan factores de transcripción como el factor determinante del sexo 9 (SOX9), considerado el principal responsable de llevar a cabo el proceso de condrogénesis (12) (Figura 2).

Estos factores de transcripción encargados del proceso condrogénico han demostrado ser inducibles mediante modelos *In vitro* (13), por lo cual se propone pueden ser utilizados para llevar a cabo una estimulación celular que permita la regeneración del cartílago articular ante un proceso de daño estructural del mismo (14).

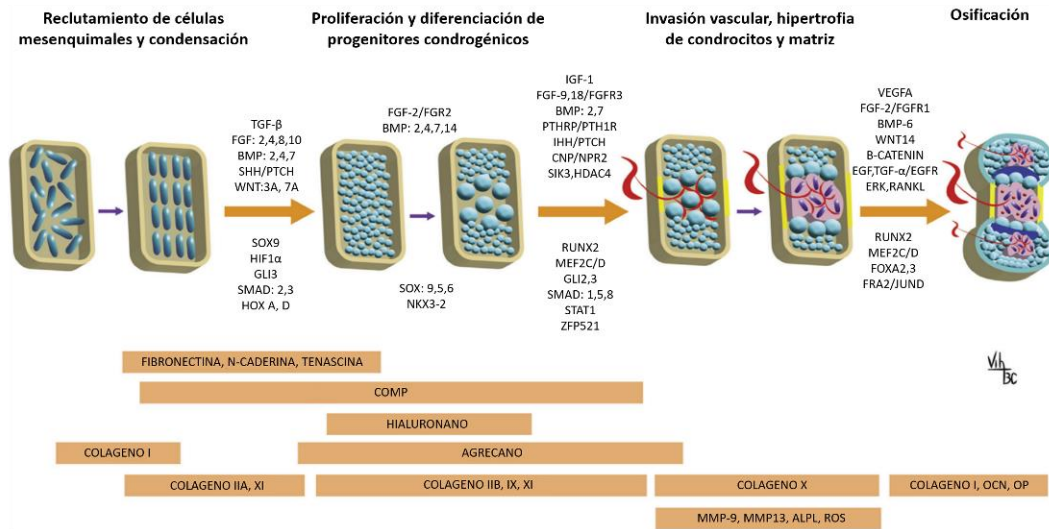


Figura 2. Maduración condrocítica y formación de cartílago y hueso. Modificado de Rodeo *et al.* 2017 (2).

El tejido articular adulto expresa las integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 10\beta 1$, $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$, y $\alpha V\beta 5$, cuya función es la de mediar la adhesión del condrocito a las proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágenos tipo II y VI), las cuales proveen señales que regulan la proliferación, supervivencia, diferenciación y remodelamiento de la matriz de cartílago mediante la activación de las proteínas MAP quinasas, resultando en la regulación de la expresión génica (15).

La importancia de la matriz extracelular para la supervivencia de los condrocitos ha sido demostrada en ratones knockout para la integrina

$\alpha 1\beta 1$, así como en aquellos deficientes en colágeno II, los cuales muestran un incremento en el número de condrocitos apoptóticos (16).

Los condrocitos son afectados por los componentes de la matriz, así como por los estímulos biomecánicos transferidos a través de la misma (17), tanto que aún se desconoce si la afección de la matriz extracelular es la que ocasiona el daño a los condrocitos y genera el proceso de degradación articular o los condrocitos son los primeros afectados y ellos generan la degradación de la matriz extracelular (17).

La modulación de los condrocitos se ve entonces regulada tanto por factores solubles (factores de crecimiento) como por los componentes de la matriz celular (cadherinas, colágeno tipo II), los cuales en conjunto generan las señales que llevan al condrocito hacia procesos de proliferación, apoptosis, activación catabólica, entre otros (Figura 3).

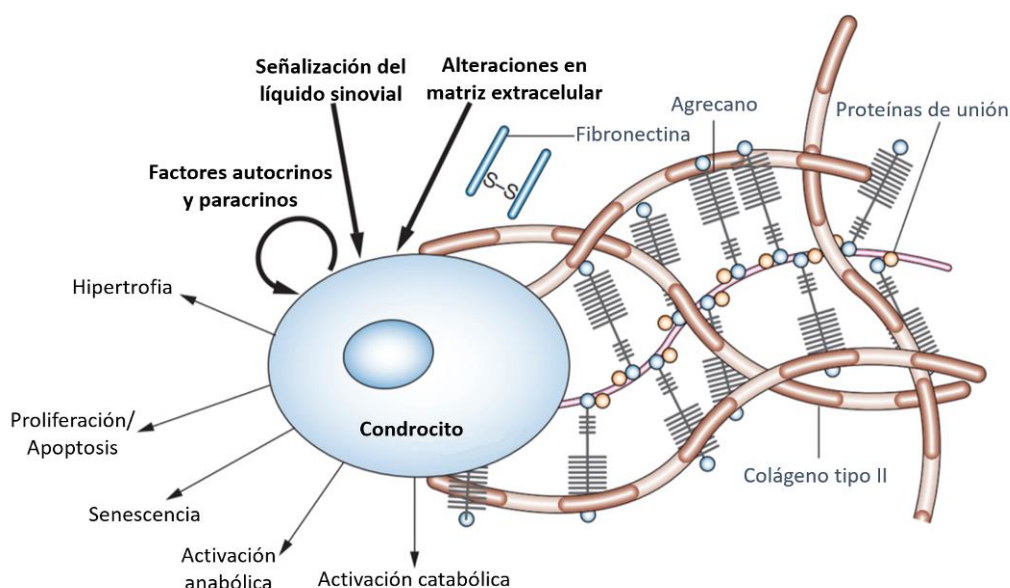


Figura 3. Factores de modulación de la actividad condrocítica. Modificado de Aigner *et al.* 2007 (17).

1.3 Daño estructural del cartílago

Los procesos de daño al cartílago articular, ya sea por traumatismo, enfermedad, así como por el desgaste natural con la edad, se han visto incrementados actualmente debido a una mayor longevidad y sobrepeso de la población mundial (18), afectando del 10% al 12% de la población (19).

Tan solo en los Estados Unidos, se realizan alrededor de 1.7 millones de cirugías osteocondrales cada año (20), encontrando lesiones en el 60% de los pacientes sometidos a una artroscopia de rodilla (5).

El proceso de apoptosis de los condrocitos puede ser inducido mediante el daño mecánico, pérdida de la matriz extracelular, pérdida de factores de crecimiento o niveles excesivos de especies reactivas de oxígeno (ROS). Donde el exceso de carga mecánica es uno de los mayores riesgos para la formación de este tipo de daño y el desarrollo de osteoartritis, ocasionando la degradación del colágeno, pérdida de glicosoaminoglicanos y apoptosis de los condrocitos (16).

El daño al cartílago articular ocasiona como principal síntoma el dolor y pérdida de movilidad de las articulaciones afectadas, progresando a la degradación de la articulación con o sin afección del hueso subcondral. Cuando la afección no es tratada, la degeneración articular conlleva a un proceso de osteoartritis.

Existen múltiples abordajes médicos posibles dependiendo la profundidad y extensión del daño, que van desde la inhibición del dolor articular mediante antiinflamatorios no esteroideos, hasta un remplazo total de rodilla como último recurso quirúrgico para el tratamiento de estas afecciones.

1.3.1 Tratamiento del daño articular.

Debido a la cualidad avascular del cartílago, este posee una muy limitada capacidad de auto regeneración, por lo que, ante un daño significativo, existen pocos abordajes médicos disponibles para su recuperación.

A pesar de la aparente simplicidad del cartílago al estar conformado a partir de un solo linaje celular (condrocitos), este tejido consiste de múltiples capas diferentes en organización, densidad celular, composición de matriz extracelular y orientación de fibras de colágeno, lo cual dificulta los abordajes de tratamiento, los cuales tratan de reparar el daño o disminuir el dolor y la falta de movilidad (19) (Figura 4):

- Tratamiento sintomático: Uso de antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de COX2 e inyecciones intraarticulares de corticosteroides, ácido hialurónico o plasma rico en plaquetas, los cuales buscan disminuir el proceso de inflamación y dolor articular.**

- Procedimientos de restauración:**
 - Microfractura del hueso subcondral. Estimulación de células troncales del hueso subcondral mediante la perforación de la capa externa del mismo, con la intención de que las células migren y generen nueva matriz extracelular como medio de relleno del daño articular, sin embargo este tejido de relleno suele deteriorarse entre 18 y 24 meses después de la cirugía (21).**

- **Autoinjerto de cartílago (mosaicoplastia).** Uso de explantes de cartílago obtenidos de un sitio donante del mismo paciente, a partir de cartílago articular de sitios no expuestos a extensa carga mecánica.
- **Implantación de condrocitos autólogos.** Consiste en tomar explantes de cartílago del propio paciente, a partir de una zona de bajo soporte de carga, realizar el aislamiento de los condrocitos embebidos en la matriz extracelular y su expansión en cultivo para posterior reimplantación en el sitio de daño. Puede ser utilizada en combinación con matrices de colágeno u otros componentes que mejoren la adhesión y soporte de los condrocitos. El uso de condrocitos autólogos es uno de los abordajes con mejores resultados clínicos, con una duración de hasta 10 años. Sin embargo, es un procedimiento altamente complejo que requiere 2 sitios de operación, un periodo largo de recuperación (6-12 meses) y puede conllevar a la degeneración del tejido donde se obtuvo el cartílago donante (21).
- **Tratamientos en desarrollo:** Consisten en la regeneración del cartílago mediante el uso de células troncales, que pueden ser aisladas de diferentes sitios donantes, las cuales tienen la capacidad de ser diferenciadas hacia condrocitos en condiciones de cultivo específicas. Así como el uso de constructos de tejido que emulen el cartílago nativo, mediante soportes naturales o sintéticos cargados con células o factores de crecimiento que permitan ser insertados en el sitio de la lesión e inicien el proceso de regeneración del daño articular.

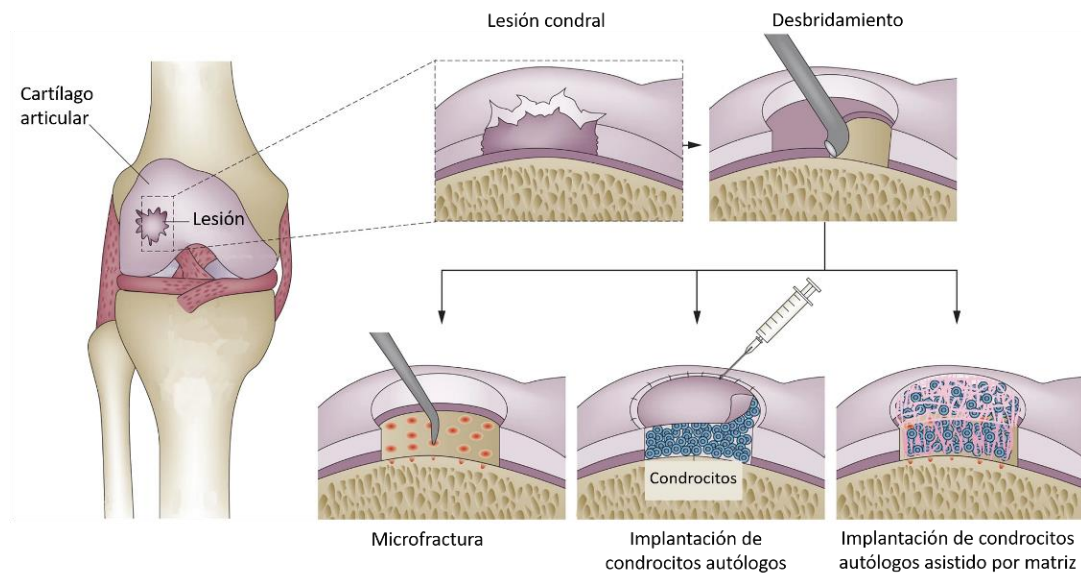


Figura 4. Abordajes quirúrgicos para la restauración de cartílago. Modificado de Makris *et al.* 2015 (21)

Este tipo de tratamientos, sintomáticos o de restauración, tratan de inhibir el dolor o rellenar el sitio de la lesión, mediante el uso del propio cartílago de un sitio donante y expansión *in vitro* de condrocitos autólogos. Estos tratamientos poseen complicaciones quirúrgicas propias del método (morbilidad del sitio donante) y son soluciones que carecen de un efecto a largo plazo (22), debido a que el tejido de relleno formado suele progresar hacia la formación de tejido fibrocartilaginoso, el cual carece de las características adecuadas, con propiedades bioquímicas y biomecánicas insuficientes para la realización de las funciones biológicas del cartílago nativo, además de contar con el inconveniente de un segundo sitio de intervención quirúrgica (23).

Es por esto que los tratamientos en desarrollo mediante ingeniería de tejidos, como el uso de células troncales, son propuestos como un método para lograr la restauración completa y a largo plazo del cartílago articular (24). Considerando también el uso de soportes estructurales para su implantación en el sitio lesionado con el fin de lograr una regeneración del cartílago, sin una degeneración hacia tejido de fibrocartílago.

1.4 Células troncales

Las células troncales son células indiferenciadas, progenitoras de todos los linajes celulares, con capacidad de autorrenovación, propiedades antiinflamatorias y con la posibilidad de ser diferenciadas hacia diferentes linajes celulares bajo su estimulación en condiciones de cultivo (25).

De forma natural, las células troncales generan una baja respuesta inmunogénica, disminuyendo el riesgo de rechazo y permitiendo el trasplante de células troncales alogénicas (26), debido a que estas poseen una baja presentación antigénica y propiedades inmunomoduladoras (27,28). Las células troncales son capaces de regular el sistema inmune mediante la secreción de factores antiinflamatorios (PGE2, IL-10 y G-CSF) (26,29,30) que al reducir las señales de inflamación, permiten la recuperación de los tejidos dañados. Estas células presentan además la capacidad de viajar a través del sistema circulatorio y adentrarse en los tejidos afectados (homing) mediante la detección de quimiocinas atrayentes (SDF-1) (31,32). Debido a estas propiedades, las células troncales son extensivamente investigadas para su uso clínico, con más de 6700 estudios clínicos activos que involucran el uso de este tipo de células, a nivel mundial (33).

Las células troncales se subdividen en diferentes categorías de acuerdo a su potencial de diferenciación (25) (Figura 5):

- **Totipotentes:** con capacidad de dividirse y producir todos los linajes celulares del organismo, así como la capacidad de formar un organismo completo, provenientes del cigoto.
- **Pluripotentes:** capaces de diferenciarse en los linajes derivados de las 3 capas germinativas (ectodermo, endodermo y mesodermo), pero sin la capacidad de formar un organismo completo, provenientes del embrión en desarrollo.
- **Multipotentes:** Derivadas de cada una de las capas germinativas, son capaces de formar múltiples linajes celulares específicos de una de dichas capas, como lo son las células troncales hematopoyéticas, neuronales, intestinales y mesenquimales, las cuales permanecen en una baja proporción en los tejidos adultos y permiten la regeneración natural de los mismos.

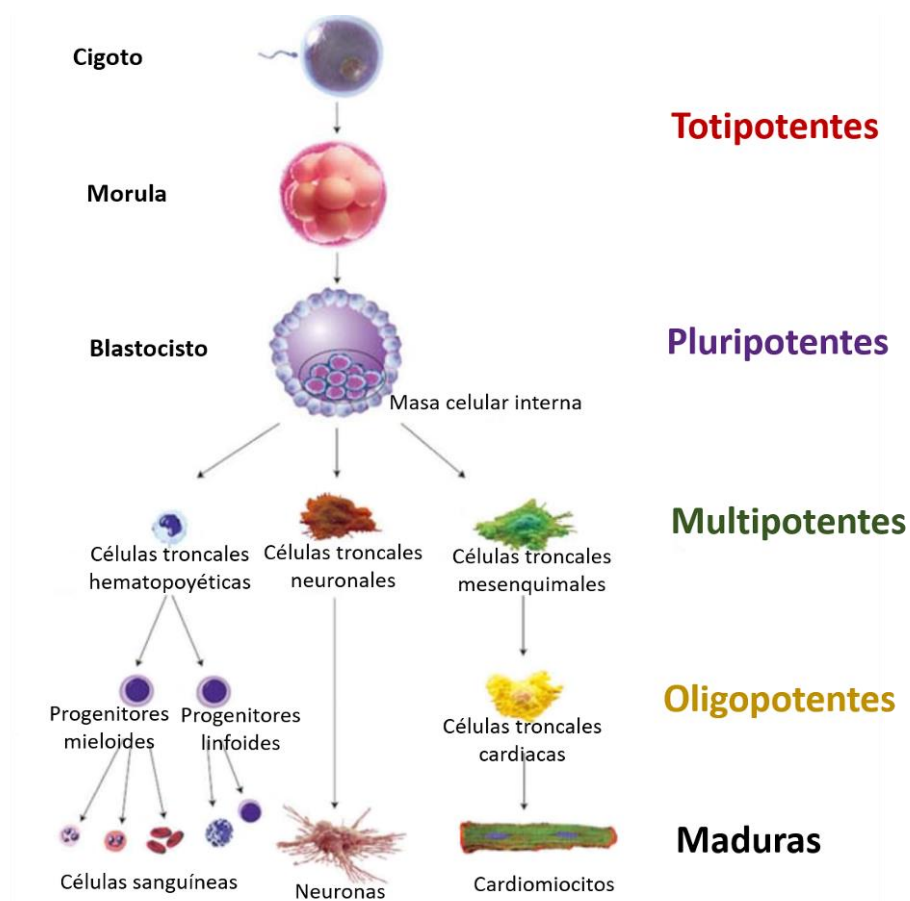


Figura 5. Categorización de las células troncales. Modificado de Yacoub *et al.* 2014 (108).

Las células troncales multipotentes permanecen en los tejidos adultos como un mecanismo de regeneración de los tejidos dañados y pueden ser aisladas y expandidas en cultivo para su utilización clínica, como el caso de las células troncales mesenquimales, derivadas del mesénquima (34).

1.4.1 Células troncales mesenquimales

Las células troncales mesenquimales (MSCs) fueron descritas por primera vez en la década de 1960 (35), como células con una importante capacidad de proliferación, y capaces de diferenciarse a diferentes linajes celulares del mesénquima, incluyendo osteocitos, adipocitos y condrocitos (36).

Estas células se caracterizan por presentar un marcaje positivo para los marcadores de membrana característicos de este subtipo como CD44⁺, CD90⁺ y CD105⁺, mientras que muestran marcaje negativo para CD45⁻ y CD14⁻ (18) que corresponden a células hematopoyéticas.

El estadio indiferenciado (multipotente) de las MSCs adultas es mantenido por la expresión de factores de transcripción como el factor a de unión a octámero (OCT3/4), Nanog homeobox (NANOG) y el factor de transcripción SRY (SOX2) los cuales regulan su capacidad de autorrenovación y permiten la capacidad de diferenciación a los linajes celulares derivados del mesénquima, como los condrocitos (37,38).

Entre estos factores, OCT3/4 se encuentra expresado de forma específica en células mesenquimales pluripotentes durante la embriogénesis, y se encuentra involucrado en los procesos del desarrollo embriogénico y mantenimiento de las células troncales, así como en crecimiento tumoral y metástasis, uniéndose a SOX2 para inducir los procesos de transcripción nuclear que mantienen el estadio indiferenciado de las células troncales (39,40)

NANOG por su parte se encarga de bloquear la diferenciación de las células troncales hacia los fenotipos especializados y coopera con OCT3/4 y SOX2 para controlar la expresión génica, manteniendo la capacidad de pluripotencia (41), encontrándose inhibidos una vez las células troncales han sido diferenciadas (40).

Estos factores (OCT3/4, SOX2 y NANOG) pueden ser localizados tanto en el núcleo como en citoplasma, con una diferente funcionalidad dependiendo de su localización celular, sin embargo estas funciones no han podido ser esclarecidas de manera precisa (39). OCT3/4, SOX2 y NANOG han demostrado además la capacidad de inducir un estado de pluripotencia a partir de células adultas somáticas transfectadas con dichos factores, permitiendo la generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), las cuales, al igual que las células troncales, pueden ser capaces de diferenciarse a los diferentes tejidos del organismo (40).

Entre las células troncales existen aquellas con diferentes niveles de troncalidad, las cuales permiten su diferenciación en mayor o menor rango de linajes celulares. Entre estas, las células troncales embrionarias son capaces de diferenciarse a los 3 linajes de las capas germinativas, y son identificadas mediante el antígeno embrionario específico de etapa (SSEA4) (42), el cual no se encuentra expresado en células mesenquimales adultas.

Debido a su posibilidad del aislamiento, uso y manipulación, las células mesenquimales se han propuesto como un método innovador de aplicación en el campo de la medicina regenerativa para el desarrollo de terapias basadas en células (20).

Mediante la utilización de agentes químicos y factores de crecimiento, es posible lograr la diferenciación de células mesenquimales hacia múltiples linajes celulares, con la intención de reponer las células perdidas debido

al daño o desgaste de los tejidos afectados, como en el caso de daño en el tejido de cartílago articular (43,44).

Las células mesenquimales pueden ser aisladas de diferentes tejidos del cuerpo humano, como medula ósea, pulpa dental, piel, cordón umbilical y tejido adiposo (45,46). Sin embargo, el tejido graso se coloca como una fuente de fácil acceso y aislamiento de células troncales mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs) (45). Las Ad-MSCs son las células mesenquimales más fácilmente accesibles, y su estudio *in vitro* ha demostrado una capacidad proliferativa y capacidad de diferenciación similar las obtenidas de medula ósea, con una capacidad de proliferación que no se ve influenciada por la edad de la persona de la que se obtienen. Siendo consideradas como la fuente ideal de células mesenquimales, al ser aisladas en cantidades relativamente grandes, con propiedades no inmunogénicas y antiinflamatorias, además de mínimas consideraciones éticas (21).

Estas células poseen un potencial de diferenciación con capacidad condrogénica. Es por esto que se propone su uso en la regeneración de daño del cartílago articular para la efectiva regeneración de este tejido (47,48).

1.4.2 Diferenciación condrogénica

Durante el proceso de diferenciación, una célula menos especializada se transforma gradualmente en un linaje celular altamente especializado, con una función y morfología limitados, reduciendo su habilidad de renovación y pluripotencia (49).

Existe un gran número de esfuerzos por lograr la diferenciación de MSCs hacia condrocitos, los cuales se basan en los mecanismos involucrados durante la diferenciación condrogénica embrionaria, utilizando condiciones de cultivo específicas para su diferenciación como el uso de

medio condrogénico (dexametasona, ácido ascórbico, insulina, transferrina y selenito), y la adición de factores de crecimiento, inductores de la diferenciación.

Debido al amplio estudio que se ha llevado a cabo en el proceso de diferenciación de MSCs a condrocitos, son múltiples los factores de crecimiento que han sido utilizados, como TGF β 1, TGF β 3, BMP2, BMP7 e IGF1 entre otros (50–52). En particular, TGF β 1, es uno de los factores clave y uno de los más comúnmente utilizados para la diferenciación condrogénica (53), el cual actúa a través de la activación de la vía de señalización de SMAD2/3.

El proceso de diferenciación condrogénica puede ser llevado a cabo también mediante el uso de otras alternativas como el co-cultivo de MSCs con condrocitos, y mediante la modulación del microambiente celular, como el uso de matrices que simulen las condiciones propias de los condrocitos (54), ya sea en condiciones de cultivo en monocapa, cultivo de alta densidad o en andamios tridimensionales.

A pesar de ser los condrocitos el único linaje celular contenido en el cartílago (4) y considerando la capacidad de diferenciación de las MSC hacia los mismos, el mayor reto para la utilización de células madre diferenciadas a condrocitos para el tratamiento de afecciones del cartílago, es el proceso de hipertrofia celular, el cual consiste en la desdiferenciación del linaje condrocítico y subsecuente recambio en la producción de matriz extracelular producida por las células diferenciadas, hacia una matriz fibrocartilaginosa.

Hasta el momento, no existe un procedimiento eficaz que logre el objetivo de obtener una línea estable de condrocitos articulares derivados de MSCs con una correcta secreción de matriz extracelular y que puedan ser utilizados en la clínica para su implementación en seres humanos.

1.5 Hipertrofia y formación de fibrocartílago

Las etapas de la formación de cartílago durante el desarrollo embrionario incluyen el proceso de condensación celular, secreción de colágenos tipo I y II, formación de interzonas y estabilización del cartílago articular. Durante este proceso, los componentes de la matriz y los factores de crecimiento juegan un papel crítico en la señalización y comunicación celular (1), permitiendo generar un fenotipo estable de condrocitos en las extremidades de los huesos largos durante la embriogénesis.

Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, el cartílago funge también como un templado temporal para el proceso de osificación endocondral de los huesos largos (36), el cual se lleva a cabo mediante los mismos procesos de condensación celular, condrogénesis, proliferación condrogénica, desdiferenciación hipertrófica y remplazo de cartílago por tejido óseo (10), por lo que los condrocitos formados como parte de este proceso incrementan su volumen celular y pasan a un estado hipertrófico, para eventualmente morir por apoptosis. Los restos celulares son removidos por fagocitosis y remplazados por osteoclastos, los cuales finalizan el remodelamiento de la matriz y son reemplazados por osteoblastos para formar el tejido óseo (4).

De manera muy similar, el proceso de hipertrofia de las MSCs diferenciadas a condrocitos se lleva a cabo a través de un cambio en la morfología celular y producción de matriz extracelular, el cual se caracteriza por un recambio en el tipo de matriz secretada por los condrocitos hipertróficos. Los condrocitos en estado hipertrófico secretan factores responsables de degradación de matriz extracelular y su calcificación (Colágeno tipo X, fosfatasa alcalina (ALP), factor vascular endotelial (VEGF), metaloproteasa de matriz (MMP13), osteopontina (OPN) y osteocalcina (OCN). Este proceso genera un recambio en los subtipos de colágeno, con un cambio en la producción de colágeno tipo II a colágeno tipo I y tipo X, y degradación del colágeno tipo II a través de la

secreción de MMP13. Mientras que el colágeno tipo X y la fosfatasa alcalina (ALP) promueven en conjunto la acumulación de calcio, mineralización del tejido e hidrólisis de fosfato orgánico para la formación de hidroxapatita. La secreción de VEGF activa la invasión vascular, resorción de la matriz y la formación de la cavidad medular (55).

Por lo tanto, los cambios fenotípicos observados en los condrocitos durante la degeneración del cartílago, asemejan a aquellos observados durante la osificación endocondral, compartiendo un mecanismo regulatorio entre ambos procesos (56).

La fase final de este proceso da lugar a un tejido de tipo fibroso, denominado fibrocartílago (Figura 6) (57).

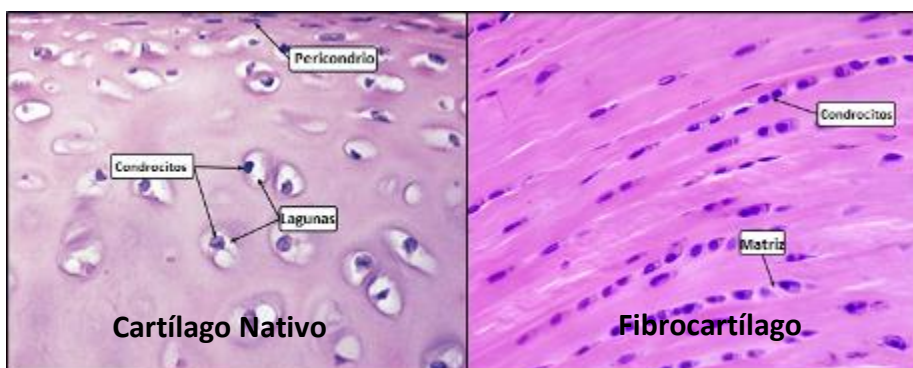


Figura 6. Histología del cartílago nativo y fibrocartílago. Modificado de Peter Takizawa (109)

El proceso de hipertrofia se encuentra modulado por un decremento en la expresión del factor de transcripción SOX9, principal promotor del proceso condrogénico mediante la estimulación de factores como colágeno II y proteoglicanos. SOX9 actúa además como un supresor del factor RUNX2, encargado del mecanismo de osificación, diferenciación osteoblástica, formación de hueso y morfogénesis esquelética (18,58). La inhibición de SOX9, conlleva por lo tanto a un aumento en la expresión de RUNX2, iniciando el proceso de hipertrofia y recambio de matriz mediante la activación de los factores COL X, VEGF, MMP13 y ALP (Figura 7).

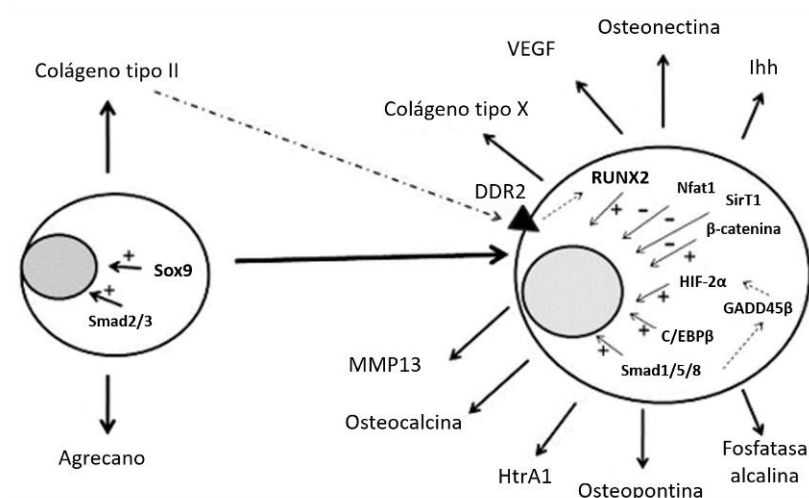


Figura 7. Hipertrofia y recambio de matriz celular. Modificado de Zhong *et al.*, 2015. (110)

Es debido a este proceso hipertrófico que los abordajes *in vitro* e *in vivo* para la regeneración de cartílago articular a partir de la diferenciación de células mesenquimales han sido insuficientes para lograr mantener un fenotipo condrocítico estable y mantener una generación de matriz extracelular similar a la del tejido nativo. Donde hasta el momento estos abordajes desarrollan una subsecuente hipertrofia y recambio de matriz extracelular, hacia la formación de tejido de fibrocartílago similar al tejido óseo.

La diferenciación de MSCs hacia condrocitos maduros y estables ha demostrado requerir una precisa combinación de factores condrogénicos y osteogénicos, existiendo cambios constantes en el microambiente local durante su progresión biológica. Esto ha sido previamente demostrado de diversas maneras; las células embrionarias diferenciadas a condrocitos expresan RUNX2 durante sus primeras etapas (18) y la generación de ratones deficientes en RUNX2 muestran una falta de maduración de los

condrocitos (18). Por lo que es necesaria una correcta modulación del tanto del microambiente como estímulos adecuados en momento y cantidad correctos, como el uso de factores de crecimiento y diferenciación, en un microambiente tridimensional propicio para la condrogénesis.

1.5.1 Estrategias para prevenir la hipertrofia

Las estrategias de regeneración de cartílago articular deben considerar, el componente celular, la adecuada interacción célula-célula y célula-matriz, mediante el uso de sistemas de soporte adecuados, el uso agentes bioactivos que permitan la adhesión celular, y la generación de un microambiente apropiado para el fenotipo condrocítico. Aunado a la apropiada adición de estimulantes o factores de crecimiento que promuevan una diferenciación hacia el fenotipo condrocítico (59), para que en conjunto logren llevar a cabo el proceso de diferenciación celular hacia un fenotipo estable (60,61).

Es importante considerar que una terapia adecuada consiste no solo en rellenar la lesión de cartílago, sino la reconstrucción de la estructura, propiedades fisicoquímicas y funcionalidad del tejido formado (4,5). Con la finalidad de alcanzar una diferenciación estable de MSCs a condrocitos se han propuesto diversas condiciones para el proceso de diferenciación, las cuales tratan de simular el proceso al presentado durante la embriogénesis (4).

- Estimulación mecánica, uso de fuerzas de compresión que estimulen genes mecano-sensitivos. Mediante el uso de biorreactores que comprimen mecánicamente el cultivo de MSCs diferenciadas en materiales tridimensionales, para simular las fuerzas de compresión a las que se somete el cartílago nativo (62,63).

- Cultivos anóxicos, mediante cultivo en condiciones de oxígeno reducido, o la activación del factor inducible de hipoxia (HIF) (activo en condiciones anaerobias), para simular el microambiente dentro de la matriz extracelular de condrocitos maduros, y su metabolismo anaerobio (64).
- Uso de condiciones de cultivo en soportes o andamios tridimensionales que simulan la compleja interacción célula-célula y célula-matriz, recreando el microambiente tridimensional del cartílago nativo. Pueden ser modificados con moléculas estimuladoras, como factores de crecimiento o mediante la incorporación de materiales bioactivos (naturales o sintéticos), como el uso de matriz de cartílago (65,66).
- Uso de factores de crecimiento y diferenciación, los cuales estimulan el proceso de diferenciación, proponiendo su uso por sí solos o en combinación. Existen múltiples factores que pueden llevar a cabo la diferenciación condrogénica, sin embargo, estos suelen utilizarse solo como una mono dosis constante durante todo el proceso de cultivo (67).

El uso de factores de crecimiento, utilizados individualmente, ha demostrado una mejora en el proceso de diferenciación y en la estabilidad del fenotipo alcanzado, con un retraso en el proceso de hipertrofia o la generación de una mayor matriz extracelular, sin embargo, no se ha logrado una total inhibición de la hipertrofia, por lo que se propone el uso de factores en esquemas de combinación, con el fin de lograr una mayor estabilidad de los condrocitos generados a partir de las MSCs (57,68).

1.5.2 Factores de crecimiento y diferenciación

Para lograr el objetivo de una diferenciación estable, es necesaria la optimización de las condiciones de cultivo, con la estimulación de las señales adecuadas en el momento de diferenciación preciso (69,70), tratando de imitar las condiciones biológicas de diferenciación a cartílago. *In vitro*, el proceso de diferenciación se caracteriza por la expresión de matriz extracelular y marcadores proteicos específicos de la etapa de diferenciación. Las MSCs (CD90, CD105) diferenciadas expresan en sus primeras etapas marcadores condrales como colágeno tipo II, agregano y proteína oligomérica de matriz de cartílago (COMP), los cuales después del proceso hipertrófico son reemplazados por marcadores osteogénicos y recambio en matriz extracelular, como colágeno tipo X, ALP y MMP13, similar a lo que sucede biológicamente en las extremidades calcificadas de los huesos largos durante la embriogénesis (Figura 8).

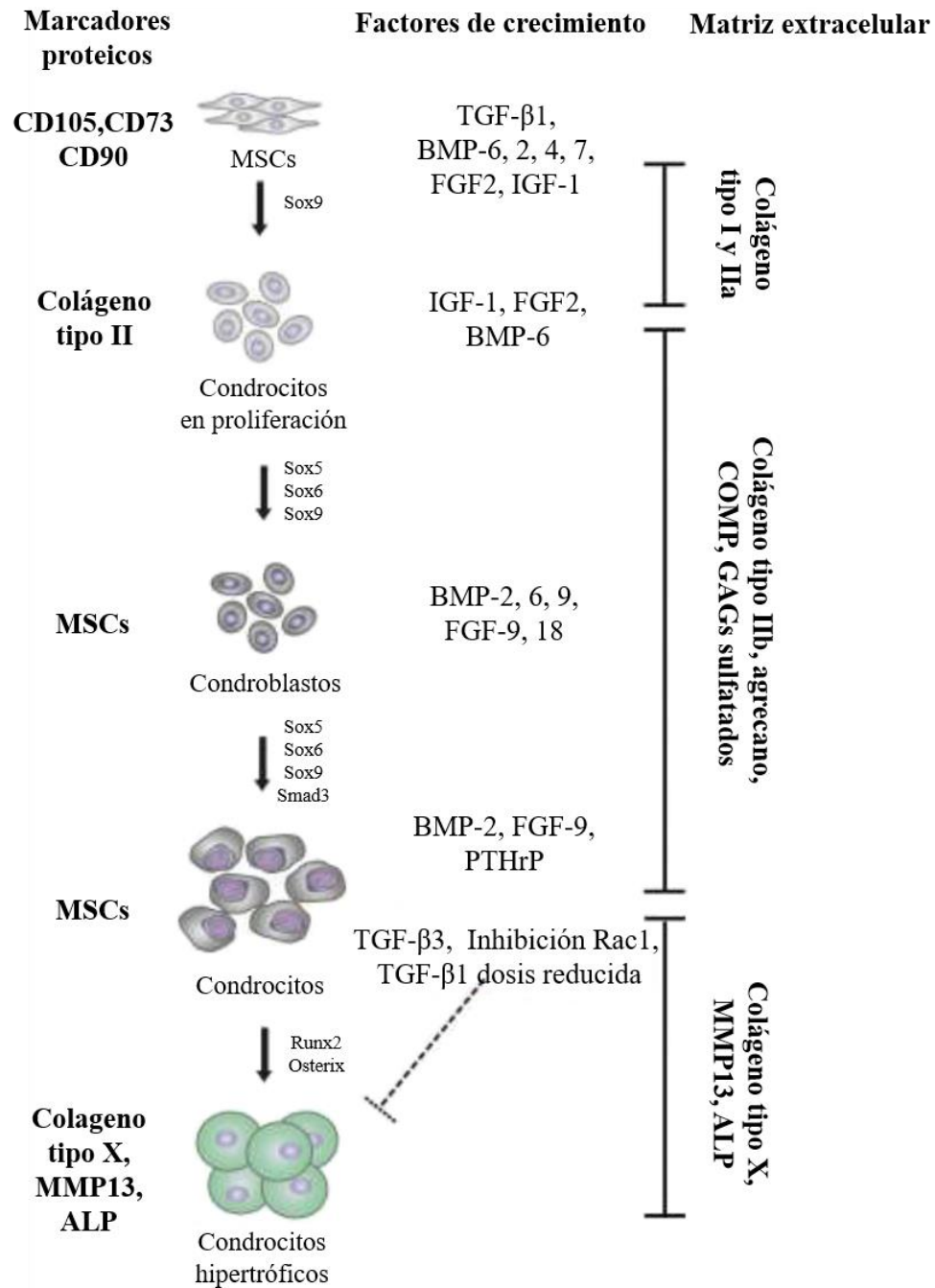


Figura 8. Proceso de diferenciación e hipertrofia *in vitro*. Modificado de Fuentes-Mera *et al.* 2017 (111).

Históricamente la diferenciación transitoria de células madre hacia condrocitos se ha llevado a cabo mediante el uso de diferentes factores de crecimiento, como FGF2, BMP2, IGF1 y TGF- β 1 (71). Estos factores activan las diferentes vías biológicas de señalización que conllevan a una diferenciación a un fenotipo similar a condrocitos (72,73), sin embargo, este tipo de tratamientos suelen ser utilizados en una monodosis continua de uno de estos factores. Este proceso, continua en mayor o menor medida, hacia la hipertrofia, debido a que estos esquemas no logran imitar las condiciones fisiológicas de la formación de cartílago estable durante la embriogénesis.

Existe evidencia de que el uso secuencial de diferentes factores, así como su combinación pueden tener efectos sinérgicos beneficiosos para la diferenciación condrocítica y producción de matriz extracelular de cartílago. Es por esto que, después de una revisión extensiva de la literatura existente, se seleccionaron los factores, y las combinaciones de los mismos, más probables de poder lograr una diferenciación estable.

1.5.2.1 FGF2

Los receptores FGFR1 y FGFR2 se encuentran en las células mesenquimales desde antes del proceso de condensación celular. Mientras que FGF2 se ha visto incrementado en el área de condensación condrogénica, siendo uno de sus primeros marcadores (74).

Se ha demostrado que el uso de FGF2 durante la fase de expansión de las MSCs aumenta su capacidad de proliferación y preconditiona las células, facilitando de forma específica el proceso de diferenciación posterior hacia el linaje condrocítico, así como a incrementar la producción de glucosaminoglicanos, a través de mecanismos independientes a la activación de SOX9. Mediante la activación de factores de transcripción nucleares tras su unión al receptor FGFR activando la vía de MAP cinasas y Wnt (35,75,76).

Sin embargo, este factor debe ser removido antes del proceso de diferenciación y cultivo tridimensional, ya que su uso prolongado conlleva a un aumento en el proceso de osificación (77).

1.5.2.2 IGF1

El uso de IGF1 es capaz por su cuenta de lograr una diferenciación de MSCs hacia condrocitos, promoviendo la síntesis de matriz extracelular (4), sin embargo, su mantenimiento en etapas tardías de diferenciación es uno de los principales promotores del proceso de hipertrofia y recambio de matriz extracelular, por lo que no es recomendable su uso continuo como monodosis, a pesar de esto, se ha observado que su uso en etapas tempranas, y en combinación con el factor de transcripción TGF β 1 poseen un efecto sinérgico, capaz de mejorar la diferenciación condrogénica (78), participando juntos en las etapas tempranas de la diferenciación biológica hacia condrocitos (50,79).

1.5.2.3 TGF β

Los factores de crecimiento más ampliamente utilizados en los estudios de regeneración de cartílago son los miembros de la familia de TGF β , especialmente TGF β 1 y TGF β 3 (21). La familia de TGF β incluye a los factores TGF- β 1, 2, 3, proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) y miostatina (GDF-8) los cuales juegan algunos de los papeles principales en el proceso de crecimiento y diferenciación condrocítica. De estos, BMP2 ha sido utilizado también para la diferenciación condrogénica, pero posee una mayor capacidad de estimulación hacia la formación de tejido óseo, lo cual no lo hace un factor condrogénico deseable. Por su parte TGF β 1 y TGF β 3 son ambos capaces por su cuenta de lograr una diferenciación de MSCs hacia condrocitos, mediante la activación del factor de transcripción SOX9, mostrando además que el uso de su uso de

TGFβ1 a dosis bajas en etapas tardías puede inhibir el proceso de osificación endocondral mediante el incremento en la expresión de la proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), así como la inhibición de colágeno X, VEGF, osteocalcina y MMP13, activando la vía de Smad 2/3 e inhibiendo al factor RUNX2 (80,81).

Este tipo de estimulación mediante factores de crecimiento y diferenciación se enfoca principalmente en la activación del factor de transcripción SOX9, el cual es clave en el proceso de condrogénesis e inhibición de RUNX2 (82,83), y lidera la diferenciación hacia el fenotipo condrocítico, sin embargo, es necesario generar un protocolo de uso de factores en tiempo y concentraciones adecuadas (84,85), así como un sistema de cultivo ideal que permita la emulación del microambiente y facilite la diferenciación celular, como lo es el cultivo en sistema tridimensional con agentes bioactivos.

1.5.3 Cultivo tridimensional

El uso de andamios o soportes tridimensionales con componentes de matriz bioactiva se considera como uno de los posibles métodos para alcanzar una reparación exitosa en lesiones de cartílago, logrando inducir una correcta modulación del microambiente para la diferenciación celular, así como proporcionar un sustrato de adhesión celular que puede ser usado como implante médico en los sitios de lesión. Para cumplir con estas funciones, los andamios deben contar con las siguientes características (4,22):

- Biocompatibilidad: Adecuada integración del andamio con el tejido adyacente, así como minimizar la reacción inmune que puede generarse por la inserción de un objeto extraño en el organismo.**

- **Biodegradabilidad:** Resorción biológica gradual del andamio, que permita su eliminación gradual al mismo tiempo que es remplazado con tejido nativo en formación.
- **Porosidad:** Presencia de poros internos, a modo de permitir la migración e interacción celular tridimensional, así como la difusión de gases, nutrientes y desechos. La regulación del tamaño de poro puede influir para la creación de microambientes aerobios o anaerobios.
- **Adhesividad:** Presencia de un sustrato capaz de permitir el anclaje de las células al andamio, así como la estimulación de receptores sensibles al microambiente.
- **Resistencia estructural y mecánica:** El soporte tridimensional debe ser capaz de soportar una carga aplicada, similar a la del tejido nativo, sin deformarse o perder volumen de forma irreversible.

El uso de una combinación de biomateriales sintéticos o naturales, como la fibroína de seda y la matriz de cartílago bovino pueden ser utilizados en conjunto, a modo de aprovechar las ventajas de cada material, como sus propiedades mecánicas y elásticas, así como sus efectos bioactivos (condro-inductivos o condro-conductivos).

Entre estos, el colágeno tipo II contenido en la matriz de cartílago, anteriormente considerado tan solo como un componente estructural de la matriz de cartílago, ha revelado actuar como una molécula de señalización extracelular, la cual tiene la capacidad de inhibir la hipertrofia de los condrocitos. El colágeno II interactúa con la integrina $\beta 1$ (ITGB1), generando una inhibición competitiva de los receptores de BMPs, inhibiendo la vía de SMAD1 (86).

Otros factores que considerar para obtener una adecuada regeneración del tejido de cartílago son la utilización de una alta densidad celular, así como el uso de MSCs pre-diferenciadas antes de su inserción en soportes

tridimensionales. Dichos factores han demostrado un incremento en la capacidad de reparación osteocondral, al emular el proceso de condensación celular durante las etapas tempranas de la condrogénesis (22). Mientras que el uso de andamios interconectados con tejido óseo (20), y uso de matriz de cartílago descelularizada, permiten mantener la estructura original del andamio, su composición y propiedades mecánicas, ayudando a las MSCs a alcanzar su diferenciación final (34).

El presente proyecto se realizó con la intención de lograr una diferenciación de Ad-MSChacia un fenotipo estable de condrocitos, los cuales mantengan su función biológica y correcta secreción de matriz extracelular, evitando el proceso de desdiferenciación y formación de fibrocartílago. Mediante el uso de estímulos químicos adecuados (84) y tiempos de aplicación correctos (85), en condiciones extrapolables al uso clínico, como el aislamiento y mantenimiento del cultivo celular en condiciones Xeno-Free (libre de componentes de origen animal). Previamente nuestro equipo de trabajo diseñó un andamio bifásico tridimensional, el cual emula las condiciones biológicas y el microambiente propio de los condrocitos, que sirve como soporte para su implantación en las zonas de daño articular, a modo de una terapia medicinal avanzada (ATMP) (20) (Figura 9).

Además de lo anterior, el análisis del proceso de diferenciación permite estudiar los mecanismos que gobiernan dicho proceso, ayudando a dirigir la experimentación futura y el efecto de los factores de crecimiento y diferenciación sobre las MSCs (34).

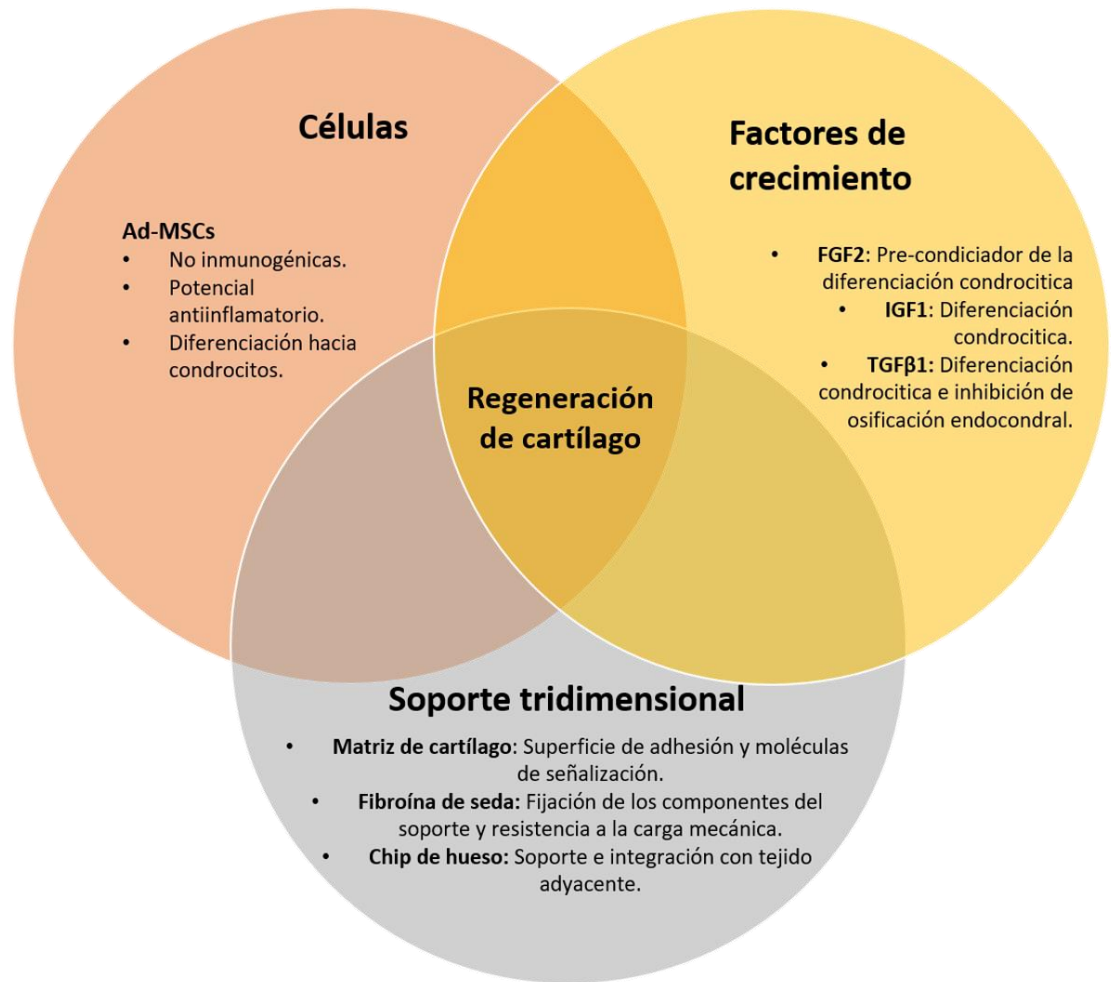


Figura 9. Componentes propuestos para la restauración de cartílago.

Capítulo II

Justificación

Hasta el momento no se dispone de una estrategia eficiente para lograr el mantenimiento de un fenotipo condrocítico estable a partir de Ad-MS, por lo que es necesario el desarrollo de un nuevo enfoque de diferenciación, con capacidad clínica, el cual emule las condiciones biológicas y el microambiente propio de los condrocitos, permitiendo una generación y mantenimiento estable de MEC comparable a la del cartílago nativo.

Además de esto, el entendimiento de los cambios temporales en los niveles de transcripción y factores de crecimiento permitirá el desarrollo futuro de estrategias controladas para la formación de cartílago articular a partir de células troncales.

Capítulo III

Hipótesis

Mediante la combinación de los factores de crecimiento FGF2, IGF1 y TGF β 1 en secuencia y concentraciones específicos de la etapa de diferenciación, es posible generar un fenotipo estable de condrocitos sin progresión a hipertrofia, manteniendo las cualidades apropiadas para su utilización clínica.

Capítulo IV

Objetivos

4.1 Objetivo general

Efectuar la exposición secuencial de factores de crecimiento sobre la diferenciación condrogénica de células troncales humanas derivadas de tejido adiposo, cultivadas en un sistema tridimensional y caracterizar el grado de mantenimiento de sus características condrogénicas.

4.2 Objetivos específicos

1. Aislar y estandarizar, bajo condiciones Xeno-free, el cultivo de células troncales mesenquimales a partir de tejido adiposo humano.
2. Evaluar, en la población aislada y expandida, la expresión de los marcadores de pluripotencialidad *SOX2*, *NANOG*, *OCT3/4*, y *SSEA4*.
3. Analizar la expresión de marcadores condrogénicos de diferenciación durante la exposición secuencial a factores de crecimiento en un sistema 3D.
4. Determinar el grado de fibrosis y sus marcadores, en etapas tempranas y tardías de los esquemas de diferenciación propuestos.

Capítulo V

Materiales y equipos

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.1 Materiales

5.1.1 Material de uso general

- Micropipeta de 100 a 1000 μ L (BioPette, cat. P3942-1000).
- Micropipeta de 20 a 200 μ L (BioPette, cat. P3942-200).
- Micropipeta de 10 a 100 μ L (BioPette, cat. P3942-100).
- Micropipeta de 2 a 20 μ L (BioPette, cat. P3942-20).
- Micropipeta de 0.5 a 10 μ L (BioPette, cat. P3942-10).
- Puntillas para micropipeta. 1000 μ L (Sorenson BioScience, cat. 10190).
- Puntillas para micropipeta. 200 μ L (Sorenson BioScience, cat. 10590).
- Puntillas para micropipeta. 10 μ L (Sorenson BioScience, cat. 23580).
- Puntillas con filtro, para micropipeta de 1000 μ L (Corning, cat. 4809).
- Puntillas con filtro, para micropipeta de 200 μ L (Corning, cat. 4810).
- Puntillas con filtro, para micropipeta de 10 μ L (Corning, cat. 4808).
- Tubos cónicos de 50mL (Corning, cat. 430829).
- Tubos cónicos de 15mL (Corning, cat. 430791).
- Microtubo de 2mL (Costar, cat. 3213).
- Microtubo de 1.7mL (Costar, cat. 3620).

- Microtubo de 0.65mL (Costar, cat. 3208).
- Microtubo para PCR 0.2mL (Axygen, cat. PCR-02-C).

5.1.2 Material para cultivo celular.

- Pipeta serológica 50mL (Stripette, cat. 4490).
- Pipeta serológica 25mL (Stripette, cat. 4489).
- Pipeta serológica 10mL (Stripette, cat. 4488).
- Pipeta serológica 5mL (Stripette, cat. 4487).
- Frasco de cultivo de 175cm² (Corning, cat. 431306).
- Frasco de cultivo de 75cm² (Corning, cat. 430641U).
- Frasco de cultivo de 25cm² (Corning, cat. 430639).
- Raspador celular de 25cm (Falcon, cat. 353086).
- Placa de 48 pozos para cultivo celular (Costar, cat. 3548).
- Placa de 24 pozos para cultivo celular (Costar, cat. 3526).
- Placa de 6 pozos para cultivo celular (Costar, cat. 3516).
- Laminillas para cultivo, 8 pozos (Falcon, cat. 354118).
- Crioviales de 2mL (Corning, cat. 431386).

5.1.3 Material para PCR.

- Placa de 96 pozos para qPCR, 0.1mL (MicroAmp, cat. N8010560).
- Film óptico para placa de qPCR (MicroAmp, cat. 4311971).

5.1.4 Material para histología.

- **Portaobjetos 75x25mm (Corning, cat. 2947-75X25).**
- **Cubreobjetos 24x50mm (Corning, cat. 2975-245).**

5.2 Equipos.

5.2.1 Equipos de uso general.

- **Centrifuga refrigerada (Eppendorf, mod. 5804R).**
- **Balanza (AND, mod. GX-2000).**
- **Plancha de calentamiento (VWR, mod. 12365).**
- **Vortex (Vortex-Genie, mod. 2).**
- **Minispin (Qualitron, mod. DW-41).**
- **Ultracongelador vertical, -80°C (Thermo, mod. TSU).**

5.2.2 Equipos para cultivo celular.

- **Campana de flujo laminar (Thermo, mod. Forma II A2 1286).**
- **Incubadora con fuente de CO₂ (Thermo, mod. Forma series II 3120).**
- **Microscopio invertido (Olympus mod. CKX41).**
- **Pipettor (Heathrow Scientific, mod. RF300).**

5.2.3 Equipos para producción de andamios bifásicos.

- **Molino pulverizador (Micron, mod. K-10).**
- **Taladro (Dremel, mod. 200).**

5.2.4 Equipos para histología.

- **Microtomo (Leica, mod. RM2235).**
- **Microscopio de fluorescencia (Olympus, mod. AX70).**
- **Microscopio campo claro (Leica, mod. DMRA).**

5.2.5 Equipos para manejo de ácidos nucleicos.

- **Termociclador para PCR punto final (Eppendorf mod. Mastercycler).**
- **Termociclador para qPCR (Applied Biosystems, mod. StepOnePlus).**
- **Nanodrop (Thermo, mod. ND-1000).**
- **Homogeneizador (QIAGEN, mod. TissueRuptor II).**
- **Cámara de electroforesis (Bio-Rad, mod. Mini-Sub cell GT).**
- **Fuente de poder (Bio-Rad, mod. PowerPac Basic).**
- **Fotodocumentador (UVP, mod. MultiDoc-It).**

Capítulo VI

Metodología

6.1 Estrategia general

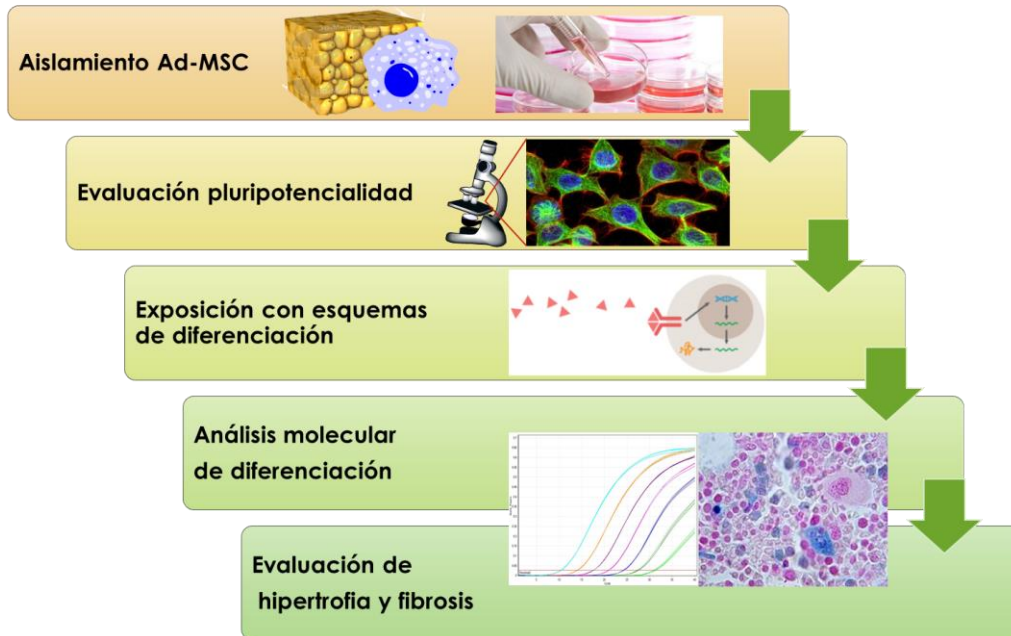


Figura 10. Estrategia general del proyecto.

6.2 Aislamiento de Ad-MSCs en condiciones Xeno-Free.

El presente proyecto fue aprobado por el comité de ética e investigación de la Facultad de Medicina y Hospital universitario “Dr. José E. González (HU) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) con numero de aprobación PI17-00360.

Para realizar el aislamiento de células troncales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSC), se realizó su extracción a partir de tejido adiposo de abdomen bajo, obtenido mediante lipoaspirado de mujeres sanas, mayores de 18 años y con serología negativa, las cuales acudieron a la realización de liposucción estética en el Centro de Especialidades Médicas (CEM), Monterrey, Nuevo León.

El tejido graso fue colectado en tubos cónicos estériles de 50mL y se mantuvo a 4°C por un máximo de 6h hasta su procesamiento. El lipoaspirado fue centrifugado a 1,000xg por 10min y se descartó la fase acuosa (sangre y solución salina propia del lipoaspirado). La fase grasa fue lavada múltiples veces (de 3 a 5) mediante la adición de PBS pH 7.4 (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄), mezclado por inversión y centrifugado a 1,000xg por 10min, para eliminar los remanentes de sangre en el tejido.

El coagulo de grasa fue colocado en un frasco estéril de 200mL y se digirió con colagenasa I (Gibco, cat. 17018029) al 0.1% diluida en PBS adicionado con gentamicina al 1%, por 30min a 37°C, con agitación media, para liberar las células embebidas en el tejido. Terminada la digestión, se detuvo la agitación y se dejó en reposo por 5min, para permitir la deposición de las células en el fondo y la separación de fases.

La fase oleosa fue colectada y desechada, y se colectó la fase acuosa en tubos cónicos estériles de 50mL, se realizó su centrifugación a 1,000xg por 5min y se descartó el sobrenadante, obteniendo un pellet celular. Posterior a esto se lavaron las células 2 veces con PBS estéril, para lo cual, las células

se resuspendieron en PBS por inversión y se centrifugaron nuevamente a 1,000xg por 5min. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en medio DMEM (Gibco, cat. 11995065), adicionado con suero humano (AB+) al 10% y antibiótico-antimicótico (Gibco, cat. 15240062) (en condiciones Xeno-free).

Las células suspendidas fueron sembradas en frascos de cultivo de 25cm² y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24h, después de este tiempo se obtuvo el sobrenadante de los frascos de cultivo (células aun no adheridas) y fueron sembradas en un nuevo frasco de cultivo de 25cm² (Subcultivo), para eliminar aquellas células que se adhieren rápidamente a la superficie de cultivo (principalmente fibroblastos).

El subcultivo se incubo en las condiciones antes descritas y se le dejo reposar durante 5 días para permitir la adhesión de las Ad-MSC al frasco de cultivo. Después de este tiempo, las células adheridas fueron lavadas suavemente con PBS estéril hasta eliminar todos los rastros de eritrocitos y otras células en suspensión.

El cultivo se mantuvo en medio de cultivo con condiciones Xeno-Free; libre de compuestos de origen no humano, a modo de permitir el uso de las células aisladas para su implantación en seres humanos, disminuyendo el riesgo de reacciones adversas, como un rechazo de las células por parte del paciente, y permitiendo el estudio de los mecanismos moleculares de diferenciación en condiciones libres de componentes de origen no humano.

6.3 Evaluación de multipotencialidad de las Ad-MSC.

Se realizó la evaluación del estadio indiferenciado (multipotencialidad) de las células aisladas. Para esto, se realizó la evaluación, por inmunofluorescencia, de los factores SOX2, NANOG, OCT3/4 y SSEA4, los cuales son los encargados de mantener el estadio indiferenciado de las células troncales mesenquimales.

Las células Ad-MSCs aisladas y expandidas en pasaje 2, fueron sembradas a una densidad de 10,000 células/pozo en laminillas de cultivo 8 pozos (Nunc, cat. 154534), e incubadas hasta alcanzar una confluencia aproximada del 90%. El medio de cultivo es retirado y las células fueron lavadas con PBS e incubadas por 5min con buffer de citoesqueleto (CB) (MES 10mM, NaCl 150mM, EGTA 5mM, MgCl 5mM y glucosa 5mM). El buffer CB fue retirado y las células fueron fijadas con formaldehído al 3% (Sigma, cat. HT501128) diluido en CB, por 10min a temperatura ambiente. El formaldehído fue retirado y las células fueron lavadas nuevamente con PBS.

Las paredes de la cámara de cultivo fueron retiradas, a modo de conservar solo la laminilla con las células adheridas, y su permeabilización celular se llevó a cabo sumergiendo las laminillas en una solución de Tritón X-100 al 0.05% durante 5min, se lavaron las laminillas con PBS y se realizó el bloqueo de sitios inespecíficos mediante la incubación de las laminillas en albumina al 0.5% durante 30min.

Para la identificación de los factores encargados de mantener el estadio multipotente de las células mesenquimales, se realizó la incubación de las

laminillas con anticuerpo primario específico contra SOX2 (Santa Cruz, cat. sc-365823), NANOG (Santa Cruz, cat. sc-293121), OCT3/4 (Santa Cruz, cat. sc-5279) y SSEA4 (Santa Cruz, cat. sc-21704) a una dilución 1:100 de cada uno de ellos, durante una noche, en cámara húmeda a 4°C. Los anticuerpos primarios fueron retirados y se realizaron 2 lavados con PBS adicionado con tween 20 al 0.01% (PBS-T).

Para la detección de los anticuerpos primarios, se realizó la incubación de las laminillas con anticuerpo secundario anti-mouse IgG (Abcam, cat. ab150113) con dilución 1:1000 durante 2h. Se retiró el anticuerpo secundario y se realizaron 2 lavados más con PBS-T. Posterior a esto, para realizar la tinción de los filamentos de actina del citoesqueleto, se incubaron las laminillas con faloidina rodaminada (Abcam, cat. ab235138) dilución 1:60 durante 2h. Se realizaron 2 lavados con PBS-T y se realizó el montaje de las laminillas con el medio de montaje VectaShield (Vector, cat. H-1200-10), el cual contiene DAPI como contratinción para los núcleos. Las laminillas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia para la evaluación de la expresión de los marcadores seleccionados.

6.4 Fabricación de andamios bifásicos

6.4.1 Matriz de cartílago bovino

Para la fabricación de andamios bifásicos osteocondrales es necesaria la preparación de matriz de cartílago bovino y chips de hueso. La matriz de cartílago fue obtenida a partir de rodillas de res obtenidas en un rastreo certificado (tipo TIF), mediante un raspado con escalpelo, de la zona de los cóndilos femorales. Obtenidas las piezas de cartílago, se realizó la remoción del componente celular (descelularización) y su molienda fina.

Para el proceso de descclularización, los fragmentos obtenidos fueron colocados en una malla plástica y se realizó su descclularización fisicoquímica mediante ciclos de congelamiento/descongelamiento, sumergiendo el cartílago en N₂ líquido hasta su completa congelación y transfiriéndolo a un baño de agua tibia (37°C) hasta su descongelamiento, realizando 5 ciclos.

Posterior a esto la matriz de cartílago fue molida mecánicamente mediante licuadora (Oster), para reducir el tamaño de partícula y se realizó una segunda descclularización mediante la utilización de detergentes y buffers hipotónicos:

- Buffer hipotónico suplementado (BHS: Tris 10mM, EDTA 2mM, KCl 100mM, MgCl₂ 5mM) por 24h a 37°C.
- Buffer hipotónico suplementado + SDS 0.5% por 22h a 37°C.
- Buffer hipotónico (BH: Tris 10mM, EDTA 2mM) + SDS 0.5% por 32h a 37°C.

- Agua ultrapura por 6h a 4°C (Cambio de agua cada hora para remover todo el SDS.)

La matriz de cartílago descelularizada fue colectada en tubos cónicos de 50mL y liofilizada durante 2 días hasta la completa remoción de humedad del tejido y se lleva a cabo su molienda fina mediante un molino de martillos (Micron) hasta un tamaño de partícula aproximado de 500µm, obteniendo un polvo fino utilizado para la producción de los andamios bifásicos.

6.4.2 Matriz de hueso bovino

Para la obtención de matriz de hueso bovino (chips de hueso) se realizó un corte transversal a la altura de los cóndilos femorales de las rodillas de res previamente utilizadas para la obtención de matriz de cartílago. A partir del corte transversal, se realizaron múltiples perforaciones con un taladro (Dremel) de broca hueca (6mm de diámetro interno) y se obtuvieron cilindros de hueso de aproximadamente 1cm de altura y 6mm de diámetro.

Para realizar la descelularización de los chips de hueso obtenidos, se realizó primero una curva de descelularización mediante la medición de diferentes ciclos de exposición a peróxido de hidrogeno al 30% (H₂O₂) (CTR). Para esto, se probaron ciclos de exposición a peróxido de hidrogeno, por 2, 5, 7.5, 10, 12.5 y 24 horas totales de exposición, para lo cual los chips de hueso fueron hervidos en agua ultrapura por 30min, los chips fueron lavados con agua fría y sumergidos en H₂O₂ por tiempos entre 1h y 30min, para ser lavados y

hervidos nuevamente en agua ultrapura y repetir el ciclo hasta alcanzar los tiempos de exposición total a H₂O₂.

Para determinar el número de ciclos, y tiempo efectivo de remoción del componente celular, se debe obtener un porcentaje mayor al 90% de descelularización, sin afección significativa la matriz del hueso bovino. Lo cual puede afectar la capacidad de unión de las células al mismo, así como su resistencia mecánica. Mediante la fórmula:

$$\% \text{ Descelularización} = 100 - \left(\frac{\text{Restos celulares}}{\text{Lagunas totales}} * 100 \right)$$

6.4.3 Ensamblaje de los andamios bifásicos

Para el ensamblaje de los andamios bifásicos osteocondrales se utilizaron moldes de politetrafluoroetileno (PTFE) perforados, con 6mm de diámetro interno, para que los chips de hueso ajusten perfectamente en el interior del cilindro.

El molde es sellado en uno de sus extremos mediante filme adhesivo (Parafilm) y cinta adhesiva, posteriormente se colocó dentro del molde una mezcla 1:1 de matriz de cartílago descelularizada y cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, cat. 71376-5KG) como agente porógeno, previamente tamizado para obtener un tamaño de partícula de entre 77 y 177µm. La mezcla fue compactada ligeramente en el fondo del molde y se añadieron 140uL de fibroína de seda al 8% (Advanced BioMatrix, cat. 5154-20ML), previamente

liofilizada y disuelta en hexafluoro isopropanol (HFIP) (Sigma, cat. 105228-1006).

El material se dejó reposar 2min para que la fibroína de seda se distribuyera entre el NaCl y la matriz de cartílago, posteriormente, un chip de hueso fue sumergido en metanol al 90% se retiró el exceso de metanol y el chip fue presionado dentro del molde de teflón hasta comprimir ligeramente la mezcla de matriz de cartílago, NaCl y fibroína de seda, con el objetivo de que la fibroína se intercale dentro del hueso y mantenga la unión entre los componentes que conforman el andamio bifásico, así como sus propiedades de resistencia mecánica y flexibilidad. El molde de teflón se tapó con un fragmento de varilla de vidrio y se deja polimerizar por 24h.

Los andamios obtenidos fueron lavados durante 3 días en agua ultrapura para eliminar el NaCl y obtener los poros del tamaño deseado (77-177 μ m). Los andamios fueron liofilizados, esterilizados mediante óxido de etileno y almacenados a temperatura ambiente hasta su uso.

6.5 Exposición secuencial a factores de crecimiento

Las células Ad-MSC obtenidas mediante el método de aislamiento xeno-free, fueron sometidas a una exposición secuencial con factores de crecimiento, en diferentes esquemas de exposición, con el fin de determinar el esquema que logre una mejor diferenciación hacia un fenotipo condrocítico, con formación de matriz extracelular similar al tejido de cartílago nativo, así como

lograr una inhibición en el proceso de hipertrofia celular y recambio de matriz celular hacia tejido de fibrocartílago.

Para esto las células fueron divididas en 6 grupos con diferentes esquemas de exposición de la forma siguiente (Figura 11):

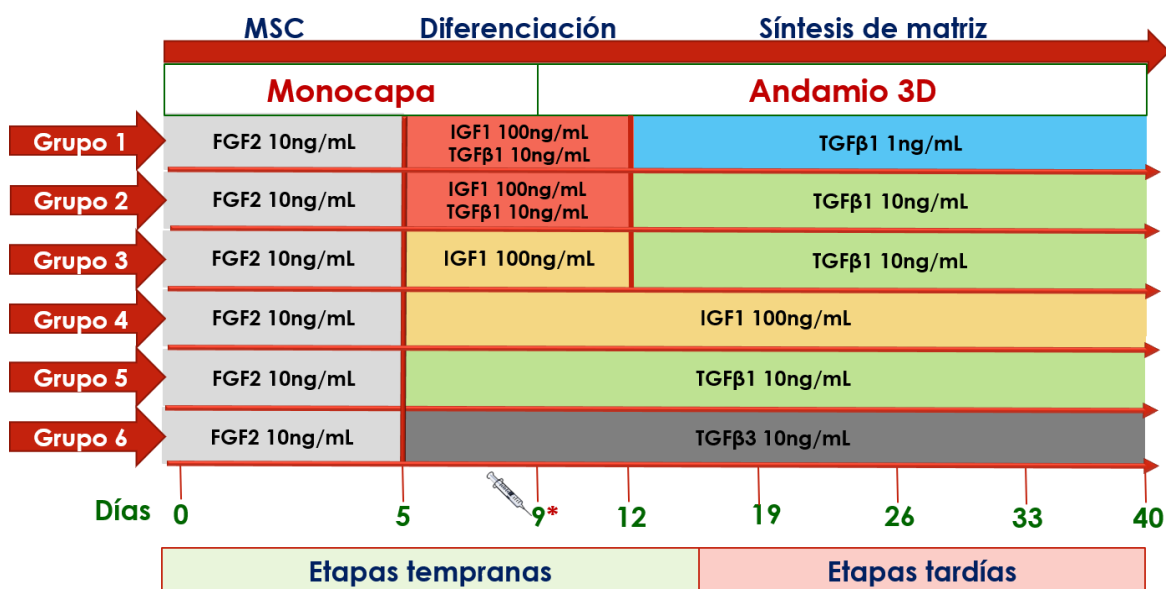


Figura 11. Esquemas de exposición a factores de crecimiento.

Las células de cada esquema de diferenciación fueron expuestas a diferentes factores de crecimiento, para lo cual se inició con células en monocapa hasta el día 9, para ser transferidas al andamio osteocondral y continuar con su esquema de diferenciación. Para cada grupo, los factores de crecimiento fueron disueltos en su medio de cultivo y se reemplazó el medio de cultivo con medio fresco adicionado con factores de crecimiento cada 2 días.

Los grupos fueron inicialmente sometidos a una exposición a FGF2 (Sigma, cat. SRP4037-50UG) a 10ng/mL durante 5 días, hasta alcanzar una confluencia

del 90%, en frascos de cultivo de 150cm². Posteriormente se retiró el FGF2 y se utilizó una combinación de IGF1 (Sigma, cat. SRP3069-100UG) a 100ng/mL y TGFβ1 (Sigma, cat. T7039-2UG) a 10ng/mL para los grupos 1 y 2, IGF1 (100ng/mL) para los grupos 3 y 4, TGFβ1 (10ng/mL) para el grupo 5 y TGFβ3 (Sigma, cat. SRP3171-10UG) a 10ng/mL para el grupo 6.

Las células siguieron los esquemas de diferenciación en monocapa hasta el día 9, donde las células fueron resuspendidas mediante tripsina al 0.25% (Gibco, cat. 15050057) para ser sembradas en la fase condral de los andamios bifásicos mediante la inyección de 300,000 Células/andamio con jeringa de 1mL, en un volumen total de 30μL. Los andamios bifásicos celularizados fueron colocados en placas de 48 pozos, manteniendo el cambio de medio por medio fresco adicionado con los factores de crecimiento cada 2 días.

Las células, ahora en el andamio bifásico, continuaron con su esquema de exposición hasta el día 12, donde el factor de crecimiento es removido y el grupo 1 es incubado con TGFβ1 a 1ng/mL, grupos 2 y 3 y 5 continúan con TGFβ1 a 10ng/mL, grupo 4 con IGF1 a 100ng/mL y grupo 6 con TGFβ3 a 10ng/mL hasta el día 40 de exposición.

Los esquemas de diferenciación fueron analizados a los 0, 5, 9, 12, 19, 26, 33 y 40 días por RT-qPCR, realizando el análisis por triplicado para cada tiempo. De la misma forma, los esquemas fueron analizados a los días 12, 19, 33 y 40 mediante técnicas histológicas, realizando el análisis por duplicado para cada tiempo.

6.5.1 Extracción de ARN.

El ARN total fue extraído mediante Trizol (Invitrogen, cat. 15596018) siguiendo el protocolo del fabricante, para lo cual, en el caso de células en monocapa el medio de cultivo fue retirado y las células fueron lavadas 2 veces con PBS en frío. El PBS fue retirado y 500µL de Trizol fueron añadidos a la monocapa en el frasco de cultivo hasta la lisis total de las células. Los 500µL de Trizol fueron colectados en un microtubo de 1.5mL y otros 500µL de Trizol fueron añadidos al frasco de cultivo para colectar los residuos del lisado que puedan haber quedado en el frasco, y colectados en el mismo microtubo.

Para la extracción de ARN de los andamios bifásicos, estos fueron separados en sus fases de cartílago y hueso. La sección de hueso fue almacenada en Trizol y congelada a -80°C, para posteriores experimentos, mientras que la sección de cartílago fue colocada en Trizol y seccionada en fragmentos pequeños mediante tijeras estériles y homogenizado mediante TissueRuptor II con punta de acero. El homogenizado fue centrifugado a 16,000xg y se colectó el sobrenadante, prosiguiendo con el protocolo descrito por el fabricante, el ARN total fue resuspendido en 50uL de agua ultrapura y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para observar su integridad, así como su análisis mediante Nanodrop 1000, para determinar su concentración.

6.5.2 Retrotranscripción

Se realizó la retrotranscripción de ARN total a ADNc a partir de 1µg de ARN de cada una de las muestras, utilizando High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat. 4368813), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, con el uso de iniciadores aleatorios, en un volumen final de 20µL.

El producto de la retrotranscripción fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, para observar el barrido típico de la retrotranscripción. El ADNc obtenido se almacenó a -20°C, hasta su utilización.

6.5.3 PCR punto final

Para determinar la expresión de marcadores mesenquimales, condrogénicos e hipertróficos, se realizó el diseño de iniciadores para los principales componentes que caracterizan dichos linajes celulares mediante el software Oligo 7, a partir de las secuencias de ARNm obtenidas mediante la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Los iniciadores diseñados hibridan entre diferentes exones de cada ARNm, lo que los hace específicos para la detección del ARNm, con una T_m aproximada de 60°C (Tabla 1).

Tabla 1. Diseño de iniciadores para identificación de marcadores condrogénicos, hipertróficos y mesenquimal.

Gen	Nombre	Forward	Reverse	Tamaño
Marcadores condrogénicos				
SOX9	Factor de transcripción SRY-Box 9	AACGGCTCCA GCAAGAACAA G	GCTCCGCCT CCTCCACGA AG	193pb
COL2A1	Colágeno tipo II alfa 1	TCATCCAGGG CTCCAATGAC GTG	AACAGTCTTG CCCCACTTAC CG	113pb
ACAN	Agrecano	CAACAATGCC CAAGACTACC AG	TTCCACTCGC CCTTCTCGTG	180pb
COMP	Proteína oligomérica de matriz	CAGACAATGA ACAGCGACCC	GCCTGCCAA TACGTTTGCT C	188pb
Marcadores hipertróficos				
RUNX2	Factor de transcripción 2 relacionado a Runt	GAACTCGTCC GCACCGACAG	ATCGTTACCC GCCATGACA GT	150pb
ALPL	Fosfatasa alcalina	CGGCCTGGAC CTCGTTGACA	ACGTTGTTCC TGTTCACTC GTA	168pb
MMP13	Metaloproteinasa de matriz 13	CGCCAGACAA ATGTGACCCTT	AAAACAGCT CCGCATCAA CC	126pb
COL10A1	Colágeno tipo X alfa 1	CAGGAAGTCC CAGCACGCAG A	CAGCGTAAA ACACTCCATG AACCA	102pb
COL1A2	Colágeno tipo I alfa 2	TAGAAAGAAC CCAGCTCGCA CA	GGTTTCGCCA GTAGAGAAA TCACA	142pb
SPP1	Osteopontina	AAGAAGTTTC GCAGACCTGA CATCC	TGCACCATTC AACTCCTCGC TTT	90pb
Marcador mesenquimal				
THY1 (CD90)	antígeno de superficie celular Thy-1	CACACATACC GCTCCCGAAC	CTGATGCCCT CACACTTGAC CA	188pb
Gen endógeno				
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa	ACAACAGCCT CAAGATCATC AGC	TCACGCCAC AGTTTCCCGG AG	172pb

Para comprobar la correcta amplificación de los iniciadores y el ADNc obtenido, se realizó una PCR punto final con el GoTaq Green Master Mix (Promega, cat. M7122), mediante el siguiente programa de temperaturas:

Tabla 2. Pasos de temperatura para PCR punto final.

	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95°C	2min
2	Desnaturalización	94°C	30s
3	Alineamiento	60°C	45s
4	Extensión	72°C	50s
Repetir del paso 2 al paso 4, 35 veces.			
5	Extensión final	72°C	10min

Una vez terminado el proceso de amplificación, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 90v, por aproximadamente 90min, junto con el marcador de peso de 100pb a 2000pb (Invitrogen, cat. 15628050) para comprobar el tamaño del fragmento amplificado por los iniciadores.

6.5.4 PCR cuantitativa

Para determinar la eficiencia de amplificación de cada par de iniciadores, se realizaron las curvas estándar de 5 puntos, con una dilución seriada a 5 concentraciones de ADNc (1000ng, 200ng, 40ng, 8ng, 1.6ng). El análisis de

eficiencia se llevó a cabo con el método de curva estándar o Pfaffl, donde el valor de 2 indica una eficiencia del 100%.

Para la qPCR se utilizó el equipo StepOnePlus (Applied Biosystems), con las siguientes condiciones de reacción:

Tabla 3. Concentraciones finales de reactivos para qPCR.

Reactivo	Concentración final
SYBR Green master mix 2x	1x
Iniciadores (10 μ M)	1 μ M
ADNc	Equiv. 1000, 200, 40, 8, 1.6ng
Agua	c.b.p 10 μ L

Utilizando las siguientes condiciones de temperatura:

Tabla 4. Pasos de temperatura utilizados para qPCR.

	Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	Activación de Taq Polimerasa	50°C	2
2	Desnaturalización inicial	95°C	2
3	Desnaturalización	95°C	15s
4	Alineamiento/Extensión	60°C	60s
Repetir del paso 3 al paso 4, 40 veces			

Una vez obtenidas las curvas estándar se tomó el umbral (Ct) determinado automáticamente por el software y se obtuvo la eficiencia de amplificación de los iniciadores diseñados graficando una curva de calibración de Ct vs Log₁₀ [ADNc] y se obtuvo la ecuación de la recta, para posteriormente usar la

pendiente de la misma para la determinación de la eficiencia con la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{\frac{-1}{m}}$$

Para considerar que nuestros iniciadores poseen una buena eficiencia de amplificación en las condiciones establecidas, la eficiencia tiene que ser 2 o lo más cercana posible a 2, lo cual indica que por cada ciclo de temperaturas la cantidad de ADN se duplica.

Verificada la eficiencia de amplificación de los iniciadores diseñados, se prosiguió con el análisis de los marcadores mesenquimales, condrogénicos e hipertróficos, para la determinación del proceso de diferenciación e hipertrofia celular de cada uno de los esquemas de tratamiento.

El análisis estadístico de las muestras fue realizado mediante anova de una vía con análisis post hoc por prueba de Tukey.

6.10 Análisis histológico.

Se realizó el análisis histológico de los andamios bifásicos celularizados con Ad-MSC diferenciadas de cada uno de los esquemas de exposición, utilizando 2 andamios por cada tiempo analizado (9, 12, 33 y 40 días). Para esto, se retiró el medio de cultivo de los andamios, se realizaron 2 lavados con PBS y se colectaron los andamios completos. Los andamios fueron fijados con solución de formalina amortiguada al 10% (Sigma, cat. HT501128)

por 48h. Posteriormente, los andamios fueron lavados con PBS y se procedió a su descalcificación mediante EDTA al 14%, siguiendo con su deshidratación gradual con acetona-xilol, para finalmente ser embebidos en parafina.

De cada bloque de muestras embebidas en parafina se realizaron cortes de 5µm mediante micrótopo, los cuales fueron colocados en portaobjetos previamente silanizados (Sigma, cat. SL2-25ML) y se procedió a su tinción histológica mediante H&E y Tricrómico de Masson (Anexo II y Anexo III), para observar la distribución del componente celular dentro del andamio, así como la formación de matriz extracelular por las células previamente diferenciadas, y la evaluación del colágeno y grado de fibrosis de la matriz formada.

A partir de las observaciones histológicas de las tinciones mencionadas se analizó la producción de matriz extracelular similar a cartílago nativo, así como su progresión hacia fibrocartílago, evaluando cada uno de los esquemas de tratamiento.

Capítulo VII

Resultados

7.1. Aislamiento y estandarización del cultivo celular Xeno-Free.

Se realizó el aislamiento de 3 líneas celulares de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSCs) a partir del lipoaspirado de 3 mujeres sanas de entre 18 y 40 años (La capacidad de diferenciación de las Ad-MSCs puede variar un poco dependiendo el sexo y las condiciones físicas del donador, sin embargo todas son capaces de lograr una diferenciación adecuada (87)). El aislamiento se llevó a cabo en condiciones xeno-free, y las células obtenidas después del proceso de subcultivo cuentan con adherencia al plástico, morfología fibroblastoide (Figura 12) y una rápida proliferación en suero humano (SH), comparado con suero bovino fetal (SBF) (Figura 13), alcanzando una confluencia del 90% en frascos de cultivo de 25cm² a los 10 días del aislamiento.

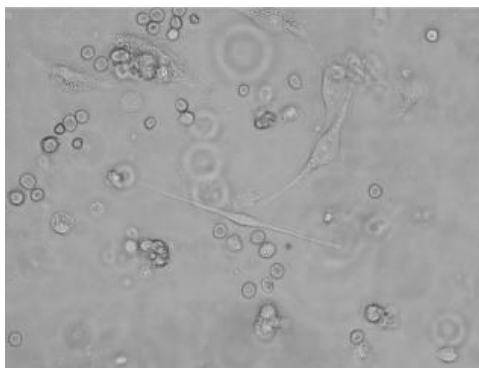


Figura 12. Cultivo primario de Ad-MSCs (3 Días).

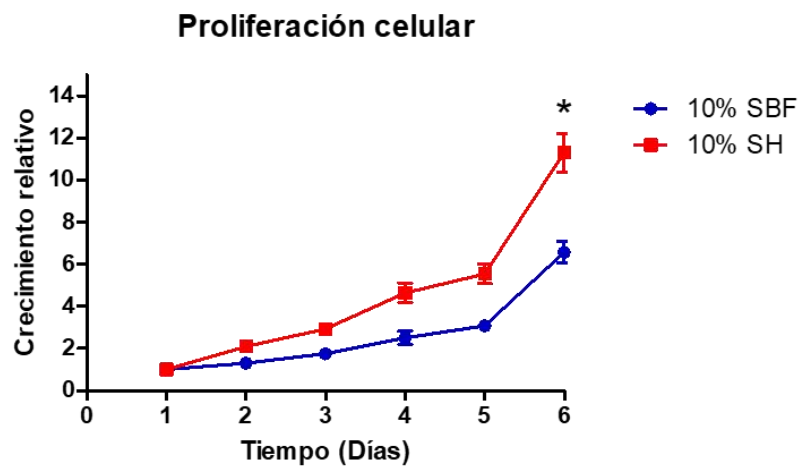
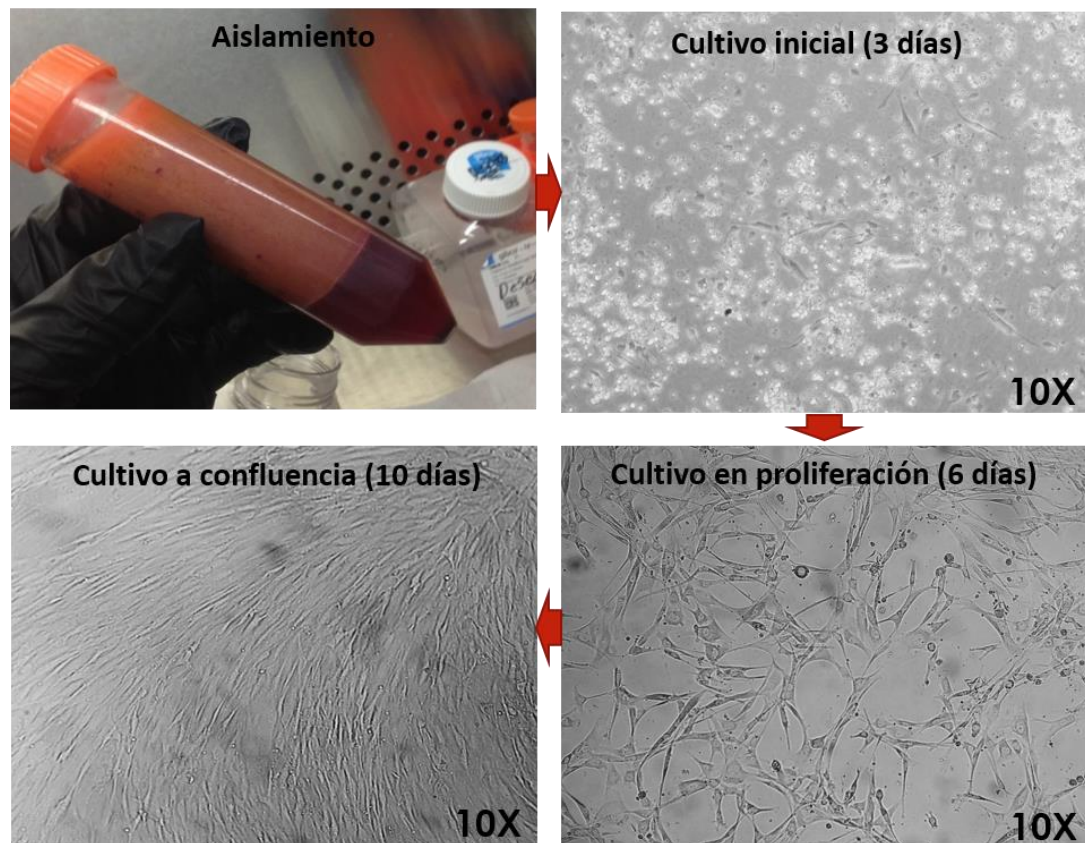


Figura 13. Morfología y proliferación celular del cultivo primario de Ad-MSCs.

Dichas características son distintivas de las células troncales mesenquimales, además de poder ser diferenciadas a los linajes condrogénico, osteogénico y adipogénico por parte del grupo de trabajo.

La capacidad de proliferación y diferenciación de las células obtenidas mediante nuestro proceso de aislamiento, y cultivo en condiciones libres de componentes de origen animal, permite el uso de estas células para aplicaciones clínicas, disminuyendo la posibilidad de un rechazo o reacción adversa a las mismas, además de inhibir posibles cambios en las vías de señalización molecular debido al uso de compuestos exógenos. Por lo que se logró establecer un método de aislamiento de Ad-MSCs, en condiciones Xeno-free (88), con características adecuadas para uso clínico (89) y un alto rendimiento en la obtención de células a partir de tejido adiposo.

7.2. Evaluación de multipotencialidad.

Se realizó la evaluación del estadio multipotente de las células mesenquimales obtenidas en nuestro aislamiento, mediante el análisis por inmunofluorescencia de los marcadores NANOG, OCT3/4, SOX2 y SSEA4, encargados de mantener las características indiferenciadas de las células troncales.

El cultivo celular aislado y expandido en condiciones xeno-free, exhibió los marcadores esperados para células troncales adultas (NANOG, OCT3/4 y SOX2) por inmunofluorescencia, mientras que mostro resultados negativos para la expresión de SSEA4, marcador específico de células troncales

embrionarias (totipotenciales), del cual se esperaba su inhibición en células troncales aisladas de adultos (Figura 14).

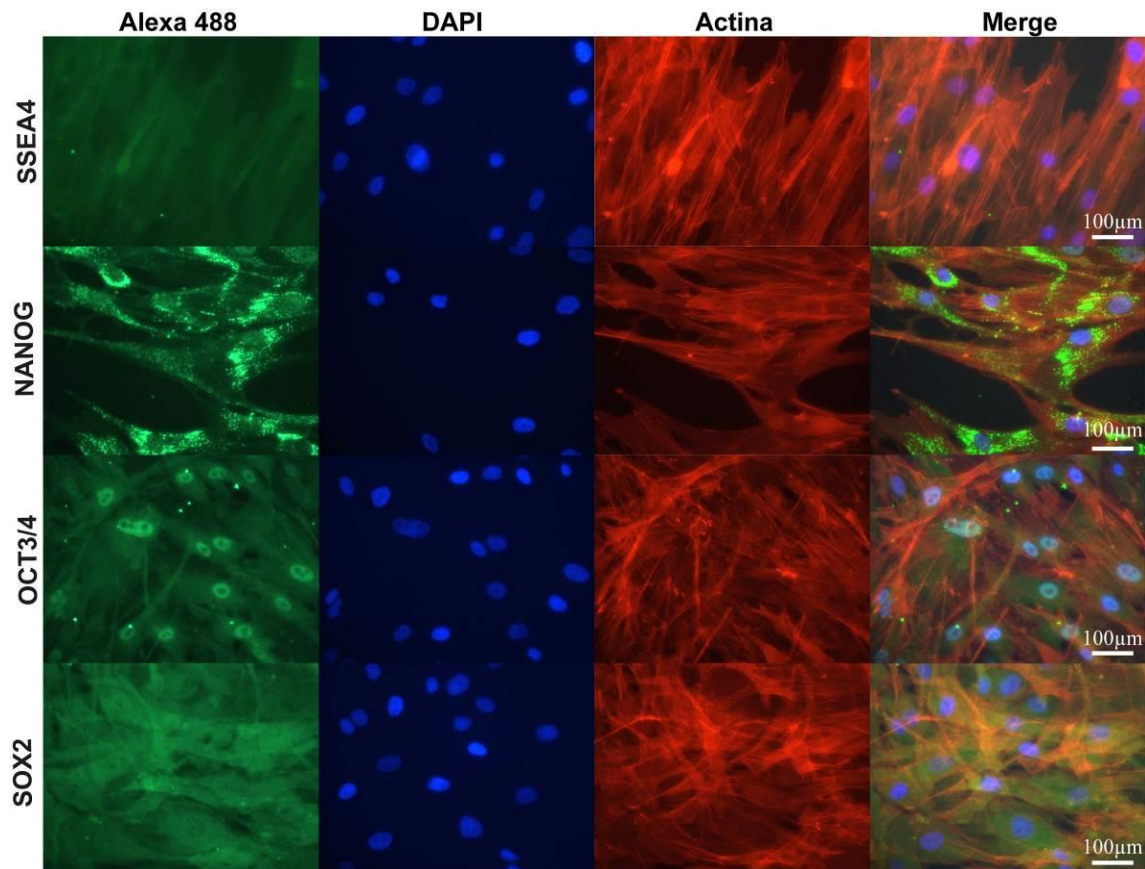


Figura 14. Inmunofluorescencia de factores SSEA4, NANOG, OCT3/4 y SOX2.

La inmunofluorescencia de las células obtenidas muestra una coloración verde intensa, debido al anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, para la presencia de los marcadores analizados, una coloración azul para los núcleos (DAPI) y una coloración roja para el citoesqueleto (Actina). Las células troncales presentan una señal positiva para los esperados en este

tipo celular (Ad-MSC) (90,91). Con presencia de NANOG, observando una señal intensa color verde principalmente en citoplasma. OCT3/4 se observa principalmente en núcleo celular, mientras que SOX2 parece encontrarse en menor intensidad y distribuida tanto en núcleo como en citoplasma.

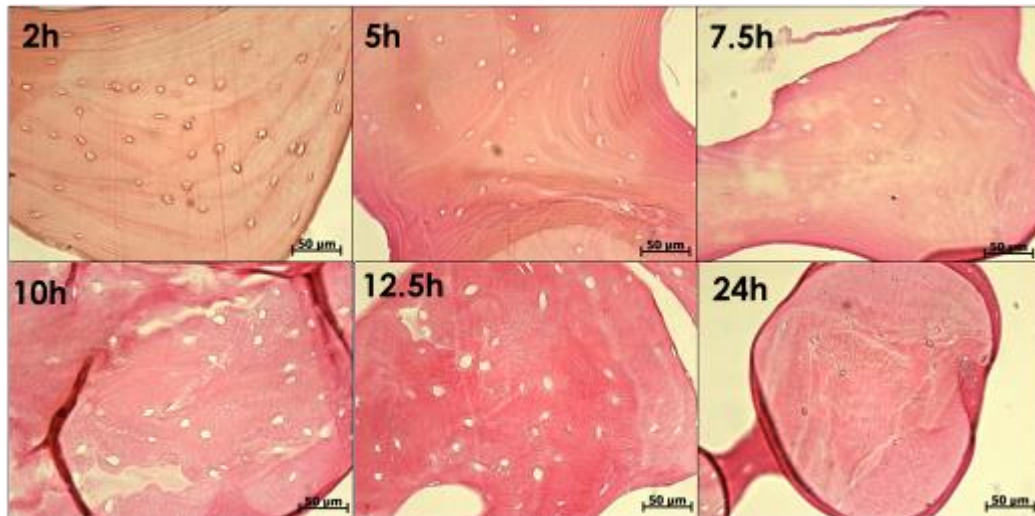
Los resultados demuestran que las células mantienen su estadio indiferenciado en el pasaje analizado (pasaje 3), por lo que las células son utilizadas en dicho pasaje para los experimentos posteriores.

7.3. Fabricación de andamios bifásicos

Se realizó la obtención de matriz de cartílago bovino a partir de 19 rodillas de res, para lo cual el cartílago fue raspado, descelularizado y molido hasta obtener un polvo fino y seco el cual fue utilizado para la fabricación de los andamios bifásicos, obteniendo un rendimiento total de 25g.

De igual forma, a partir de las rodillas de res utilizadas para la obtención de cartílago, se obtuvo la matriz de hueso (chips de hueso), necesaria para la fase ósea de nuestro soporte tridimensional.

Para determinar la correcta descelularización de los chips de hueso, estos fueron analizados a diferentes ciclos de exposición con peróxido de hidrogeno y agua hirviendo como método de descelularización (Figura 15).



A *Figura 15.* Descelularización de matriz de hueso bovino. **partir**

del análisis de los restos celulares y las lagunas vacías, se determinó una exposición de 5h en peróxido de hidrogeno como el tiempo óptimo para lograr una correcta descelularización, sin comprometer la matriz ósea obtenida, obteniendo un 93% de descelularización del tejido óseo (Figura 16). El incremento en el tiempo de exposición a peróxido no muestra una mejoría significativa, sin embargo, debilita la matriz de hueso, comprometiendo la adhesión celular, así como las propiedades mecánicas del soporte.



Figura 16. Porcentajes de descelularización

Una vez determinado el tiempo de exposición adecuado para la descelularización de la matriz ósea, se procesaron los chips de hueso y se obtuvieron alrededor de 600 chips de hueso descelularizados, de 6mm de diámetro por 4mm de altura, con una textura porosa (Figura 17).



Figura 17. Matriz de cartílago y hueso bovinos descelularizados

Una vez obtenidos los elementos necesarios, se realizó la fabricación de andamios bifásicos para el cultivo tridimensional de las Ad-MSCs mediante la incorporación de la matriz de cartílago, fibroína de seda, NaCl y los chips de hueso, para generar un soporte tridimensional, con una fase superior (2mm) que simula las condiciones propias del cartílago nativo y posee las características necesarias para su implantación en zonas de daño.

Los andamios bifásicos obtenidos, presentaron flexibilidad y resistencia mecánica a la compresión, con una fase superior de 2mm la cual simula el cartílago nativo y una fase inferior de 4mm con matriz ósea descelularizada que funciona como soporte para la integración del cartílago con el tejido adyacente (Figura 18).

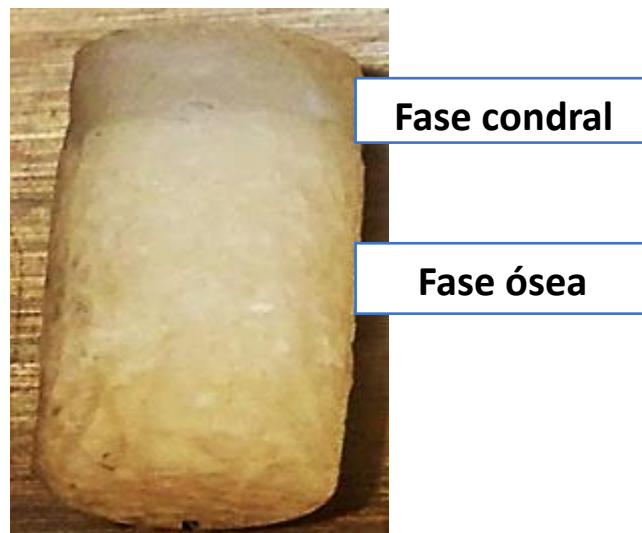


Figura 18. Andamio bifásico osteocondral ensamblado.

7.4 Exposición secuencial a factores de crecimiento

Las células Ad-MSC fueron expuestas a los diferentes esquemas de diferenciación en monocapa, para después ser sembradas en la fase condral de los andamios generados y continuar con el proceso de diferenciación.

Estos esquemas de exposición a factores de crecimiento se establecieron con la intención de generar una correcta diferenciación celular hacia condrocitos, así como evitar o inhibir el proceso de hipertrofia y recambio de la matriz celular hacia fibrocartílago durante el tiempo analizado (40 días).

Para realizar la evaluación del proceso de diferenciación condrogénica e hipertrofia, se realizó el diseño de iniciadores para medir la expresión de marcadores mesenquimales, condrogénicos e hipertróficos, así como la evaluación de amplificación y eficiencia de los mismos.

7.4.1 Evaluación de eficiencia de los iniciadores

Para evaluar la eficiencia de los iniciadores, se realizó en primer lugar una extracción de ARN total a partir de Ad-MSC (marcador mesenquimal), Ad-MSC diferenciadas hacia condrocitos (marcadores condrogénicos) y Ad-MSC diferenciadas a osteocitos (marcadores hipertróficos). Las células fueron cultivadas en monocapa y se realizó su extracción de ARN total y retrotranscripción a ADNc (Figura 19).

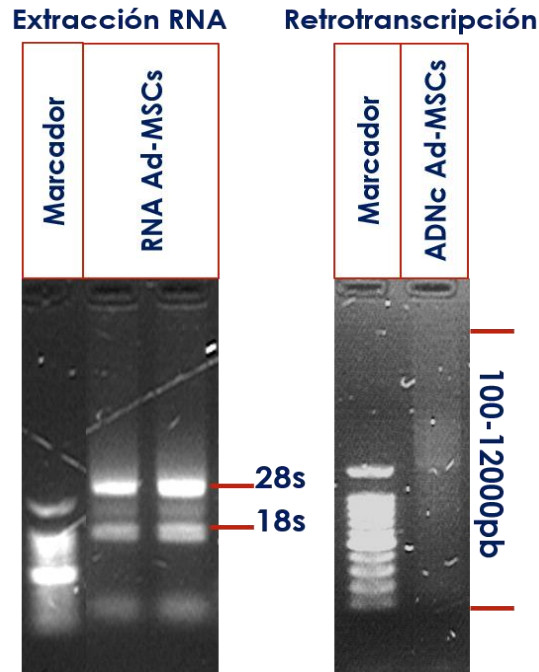


Figura 19. Electroforesis del RNA total aislado y retrotranscripción a ADNc.

Se obtuvo una adecuada integridad del ARN mediante el método de Trizol, donde logran observarse las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales 18s y 28s las cuales indican que el RNA no se encuentra degradado. Se realizó la retrotranscripción de RNA a ADNc, donde logra observarse el barrido característico aproximado de entre 100 y 12000 pb, generado por el uso de iniciadores aleatorios.

A partir del ADNc se realizó una reacción de PCR punto final con cada uno de los iniciadores diseñados, para verificar su capacidad de amplificación, generando bandas únicas, sin amplificaciones inespecíficas y en el tamaño molecular esperado de acuerdo con el diseño de los iniciadores de la tabla 2 (Figura 20).

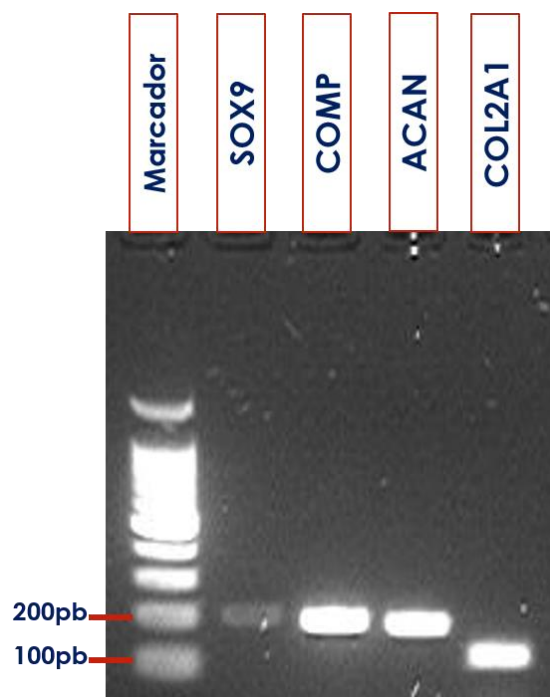


Figura 20. PCR punto final con los iniciadores diseñados.

Una vez determinada la correcta capacidad de amplificación de los iniciadores, se evaluó su eficiencia de amplificación, mediante una curva de eficiencia para cada uno de ellos, mediante PCR cuantitativa.

Para realizar las curvas de eficiencia, se utilizaron 5 puntos de concentración de ADNc (1000, 500, 40, 8 y 1.6ng) y se efectuó el análisis por qPCR de cada uno de los pares de iniciadores diseñados, a las diferentes concentraciones de ADNc, obteniendo las líneas de amplificación, sin amplificaciones inespecíficas detectadas por Melt curve, obteniendo un solo pico de disociación en la gráfica (Figura 21).

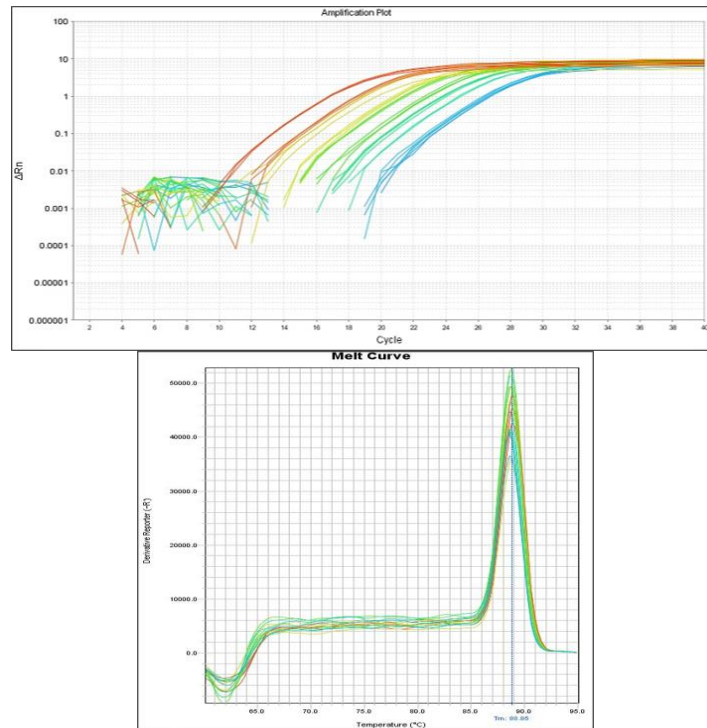


Figura 21. qPCR para determinación de eficiencia de iniciadores diseñados.

Una vez obteniendo el C_t , predeterminado por el equipo, de cada primer analizado, se realizó la gráfica del \log_2 (Concentración de ADNc) (eje X) vs C_t obtenido (eje Y), para obtener la ecuación de la recta (Figura 22).

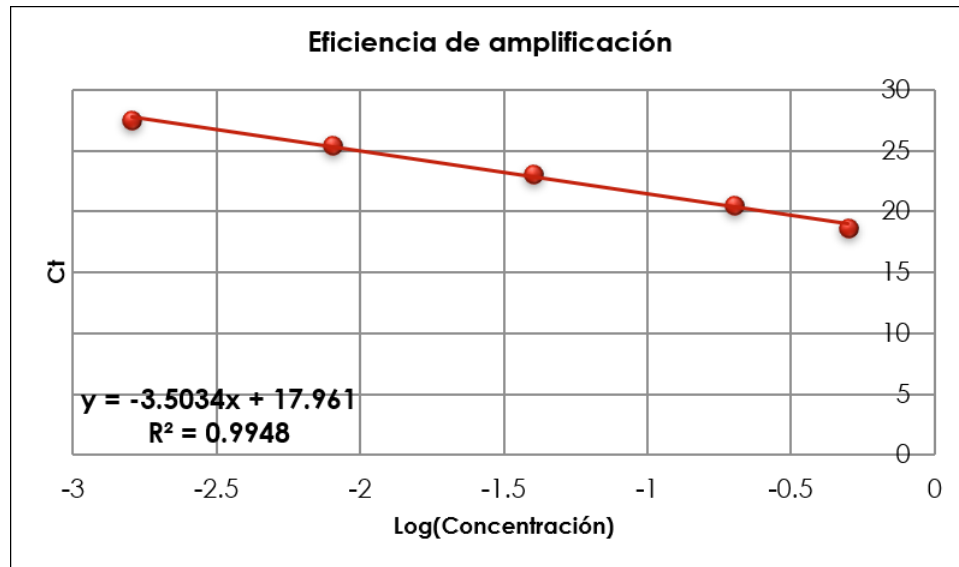


Figura 22. Gráfico de eficiencia de amplificación.

La eficiencia de amplificación se determinó a partir de la pendiente de la recta (m), mediante la fórmula: $2^{(-1/m)}$.

A partir de los datos graficados se determinaron las eficiencias de amplificación de los iniciadores diseñados (Tabla 5):

Tabla 5. Eficiencia de iniciadores para PCR.

Marcadores condrogénicos			
Gen	Eficiencia	Gen	Eficiencia
SOX9	2.00	COMP	1.93
ACAN	2.00	COL2A1	1.89
Marcadores hipertróficos			
RUNX2	2.00	COL10A1	2.00
ALPL	1.90	COL1A2	1.92
MMP13	1.91	SPP1	1.95
Marcador mesenquimal			
THY1 (CD90)	2.01		
Gen endógeno			
GAPDH	2.08		

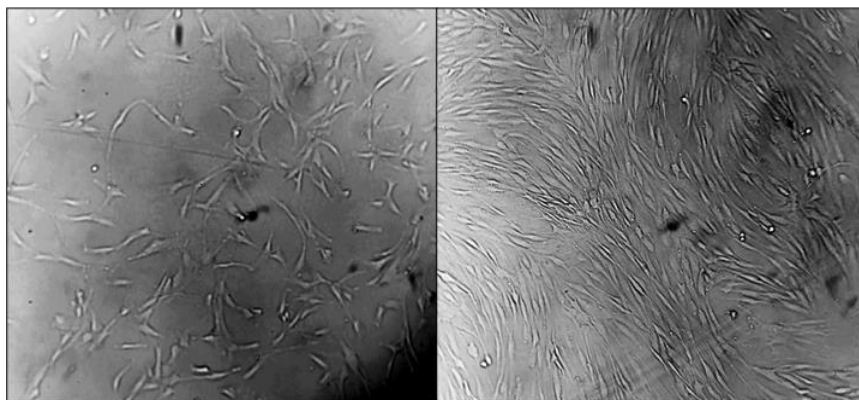
Se obtuvieron eficiencias cercanas a 2.00 en los pares de iniciadores analizados, lo cual significa una amplificación óptima, donde en cada ciclo de PCR se duplica la cantidad de material genético, por lo que los iniciadores son adecuados para ser utilizados en la evaluación del proceso de diferenciación e hipertrofia.

7.4.2 Evaluación microscópica de la diferenciación condrogénica

Durante el proceso de diferenciación de Ad-MSCs hacia condrocitos, se realizó una evaluación microscópica de las células durante todo el proceso con los distintos esquemas de exposición.

Durante las primeras etapas de exposición de las células a los factores de crecimiento, se observa como las células tratadas con FGF2 a 10ng/mL presentan un aumento en la velocidad de proliferación, comparado con las células cultivadas al mismo tiempo en condiciones sin FGF2. Dicho aumento de proliferación se demuestra en el incremento en los niveles de confluencia de las células dentro de los frascos de cultivo, incrementándose rápidamente con el uso de FGF2 y alcanzando niveles de confluencia mayores al 90% en tan solo 5 días de cultivo (Figura 23), lo cual indica que este factor de crecimiento se encuentra estimulando las Ad-MSCs.

Ad-MSC en FGF2 10ng/mL



Ad-MSCs a 5 días **sin** FGF2. Ad-MSCs a 5 días **con** FGF2.

Figura 23. Cultivo celular con y sin factor FGF2.

De la misma forma, se observó en todos los esquemas de diferenciación, la formación de agregados celulares (condroesferas) a los 7 días de diferenciación en grupos control de células que no fueron transferidas al andamio osteocondral (Figura 24). La formación de agregados es parte del proceso de condensación celular y es la primera etapa de la diferenciación condrogénica en monocapa, por lo que todos los esquemas de exposición parecen ser capaces de producir la diferenciación celular de Ad-MSCs hacia condrocitos. Sin embargo, es necesario realizar la evaluación de aquel esquema que logre una diferenciación sostenida y sin progresión hacia hipertrofia y degeneración de la matriz celular.

Diferenciación en Ad-MSCs no transferidas al andamio

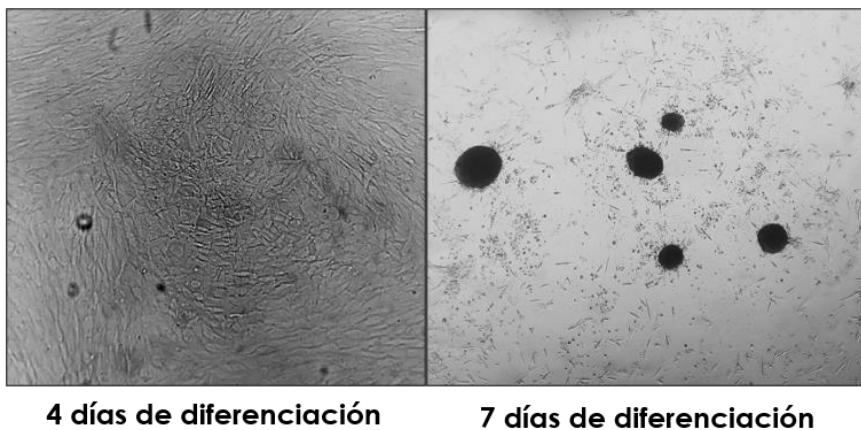


Figura 24. Ad-MSCs expuestas a medio de diferenciación.
Se observaron condroesferas al día 7.

7.4.3 Evaluación de marcadores de diferenciación condrogénica.

La evaluación del proceso de diferenciación de las Ad-MSCs hacia condrocitos se realizó mediante la medición de los niveles de expresión de ARNm de los principales marcadores propios de las etapas de diferenciación condrogénica y producción de matriz extracelular.

Los patrones de expresión de los ARNm fueron analizados mediante qPCR a diferentes tiempos de exposición a cada esquema de diferenciación con factores de crecimiento (Figura 25), donde la expresión de cada uno de los marcadores condrogénicos fue analizada en la Tabla 6.

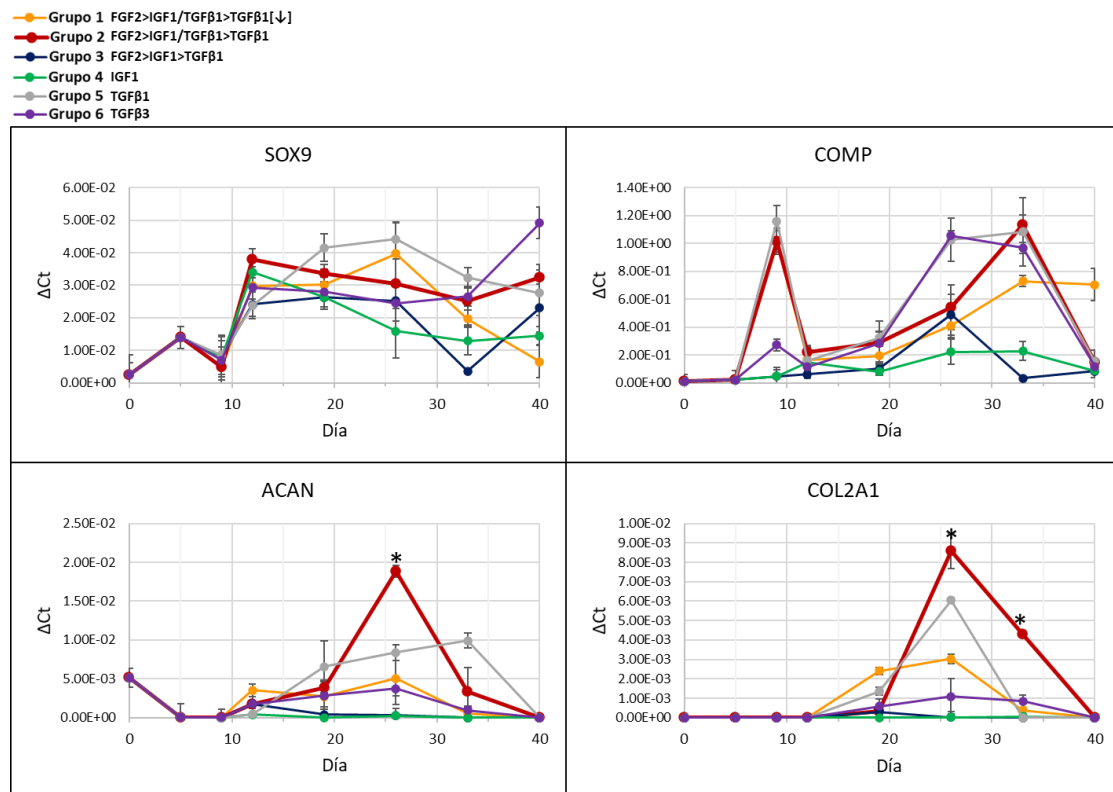


Figura 25. Análisis de expresión de marcadores de diferenciación condrogénica.

Tabla 6. Descripción de los marcadores de diferenciación condrogénica.

Marcador	Expresión
SOX9	Todos los esquemas de exposición presentan un incremento en la expresión de SOX9 a partir de la etapa de diferenciación (día 12), la cual se mantiene relativamente estable durante los días de exposición, con una tendencia a disminuir a partir del día 26.
COMP	COMP presenta una alta expresión durante la etapa de pre-diferenciación (día 9), la cual presenta un “reset” o disminución de sus niveles de expresión después de la transferencia del cultivo en monofase al cultivo 3D, para aumentar durante la etapa de síntesis de matriz (días 26 a 33) y disminuir al día 40. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía.
ACAN	Presenta un aumento de expresión en la etapa de síntesis de matriz a los 26 días, donde ACAN es uno de los principales componentes de la matriz, y su disminución posterior a los 33 y 40 días. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía. Grupo 2 presenta diferencia significativa con respecto a los demás grupos (prueba de Tukey).
COL2A1	Similar a la expresión de ACAN, COL2A1 comienza su expresión a los 19 días y aumenta su expresión durante el periodo de síntesis de matriz a los 26 días, manteniéndose hasta los 33 días y disminuir a los 40 días. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía. Grupo 2 presenta diferencia significativa con respecto a los demás grupos (prueba de Tukey).

Los patrones de expresión de marcadores condrogénicos indican que todos los grupos llevan a cabo un proceso de diferenciación condrogénica, sin embargo, el grupo 2 (FGF2>IGF1/TGFβ1>TGFβ1) presenta los mejores patrones de expresión de los componentes de matriz celular ACAN y COL2A1.

Los grupos 3 y 4, con IGF1 como su principal componente, muestran una escasa expresión de marcadores de diferenciación, evidenciando el efecto sinérgico del uso de IGF1+TGF-β1(78), en la diferenciación de MSCs al fenotipo condrocítico, donde el uso de IGF1 como unidosis continua (grupo

4) muestra los menores patrones de diferenciación, con escasa expresión de los componentes de matriz ACAN y COL2A1.

7.4.4 Evaluación de marcadores de diferenciación hipertrófica.

Los patrones de expresión de ARNm de marcadores hipertróficos fueron analizados por qPCR (Figura 26), y la expresión de cada uno de estos marcadores fue analizada en la Tabla 7.

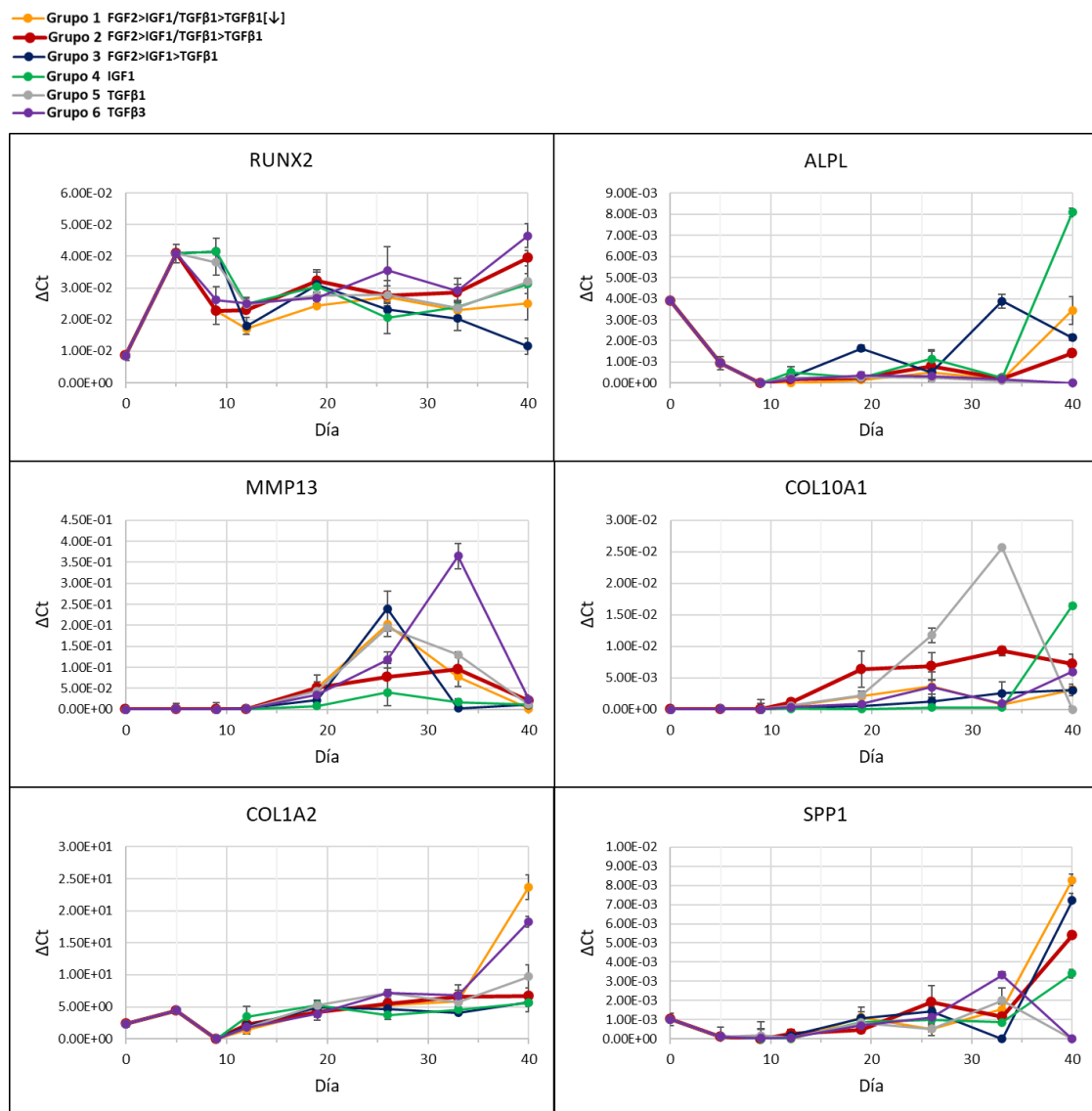


Figura 26. Análisis de expresión de marcadores de diferenciación hipertrófica.

Tabla 7. Descripción de los marcadores de diferenciación hipertrófica.

Marcador	Expresión
<i>RUNX2</i>	El marcador osteogénico RUNX2 presenta un incremento durante el preconditionamiento con FGF2 (día 5) y mantiene una expresión relativamente estable durante los 40 días de cultivo.
<i>ALPL</i>	ALPL muestra expresión desde el cultivo de Ad-MSC sin tratamiento, y mantiene una baja expresión durante la diferenciación y síntesis de matriz, hasta aumentar al día 40.
<i>MMP13</i>	La expresión de MMP13 comienza a aumentar a partir del día 19 de exposición, con un máximo de expresión entre los 26 y 33 días de cultivo y disminuye a los 40 días. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía.
<i>COL10</i>	COL10 mantiene una baja expresión, con un aumento a partir del día 19, con una máxima expresión entre los 33 y 40 días. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía.
<i>COL1A2</i>	La expresión de COL1A2 se mantiene relativamente estable durante todo el periodo de exposición, con un aumento de expresión en el día 40. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía.
<i>SPP1</i>	SPP1 presenta un perfil de expresión similar a COL1A2, manteniendo una expresión reducida durante el proceso de exposición, con incremento hasta el día 40. Diferencia significativa entre grupos determinada por ANOVA de una vía.

La expresión de marcadores de diferenciación osteogénica (hipertrofia) se observa en todos los esquemas de diferenciación, sin embargo, el grupo 2 (FGF2>IGF1/TGFβ1>TGF-β1) expresa algunos de los niveles más bajos de expresión de dichos marcadores, con una baja expresión de ALP, MMP13 y COL1A2, principales componentes para el recambio de matriz hacia el tejido de fibrocartílago. El grupo 2 mantiene además uno de los mejores perfiles de expresión de marcadores condrogénicos, contrario al grupo 4 (FGF2>IGF1),

el cual expresa los menores niveles de marcadores hipertróficos, sin embargo, posee una muy pobre diferenciación al fenotipo condrocítico.

7.4.5 Evaluación del marcador mesenquimal.

Durante el proceso de diferenciación de las Ad-MSCs hacia condrocitos se evaluó la expresión del marcador mesenquimal THY1 (CD90), mediante sus niveles de expresión de ARNm (Figura 27).

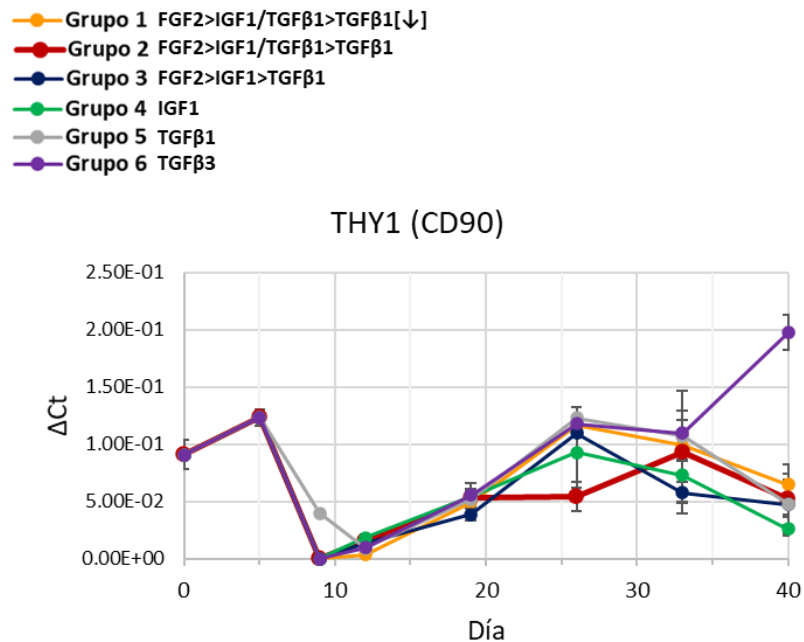


Figura 27. Análisis de expresión del marcador mesenquimal CD90

La expresión de THY1 (CD90) se observa durante el crecimiento de las células mesenquimales sin tratamiento (día 0), con un aumento en su expresión

durante el acondicionamiento con FGF2 y una posterior disminución de este al retirar FGF2 durante la fase de diferenciación, con un aumento posterior en los días de exposición (día 20 a 40).

7.4.6 Evaluación histológica.

Para evaluar la migración celular dentro del andamio osteocondral y la producción de matriz extracelular generada por las Ad-MSCs diferenciadas mediante los de los esquemas propuestos, se llevó a cabo evaluación histológica de los andamios bifásicos mediante las tinciones de H&E y Tricrómico de Masson, cuyos resultados se muestran a continuación.

7.4.6.1 Análisis de migración.

Se observó el patrón de migración de las Ad-MSCs, pre-diferenciadas a condrocitos, dentro del andamio bifásico mediante H&E a los 3 días de cultivo posteriores a que dichas células fueran sembradas en el andamio. La fase superior (condral) y la fase inferior (ósea) pueden ser observadas en el corte longitudinal de los andamios, con bordes bien delimitados (línea punteada). Las células pueden ser localizadas por la coloración oscura de sus núcleos (flechas azules), encontrándose localizadas en las lagunas vacías de la matriz de cartílago descelularizada de la fase condral. Por su parte, la fase ósea presenta solo lagunas vacías (flechas rojas) (Figura 28 y ampliación de la fase condral en Figura 29).

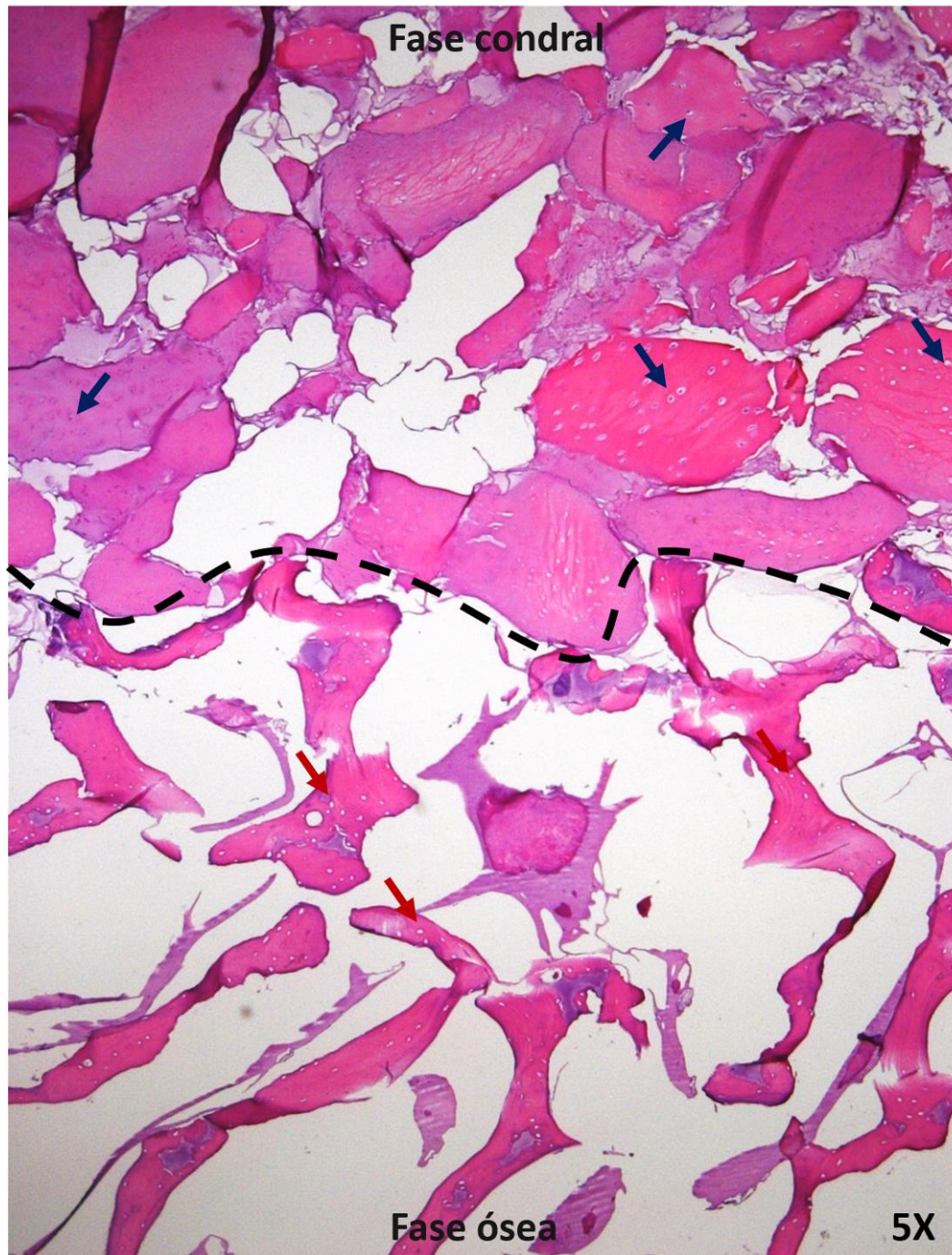


Figura 28. Análisis de migración celular dentro del andamio bifásico.

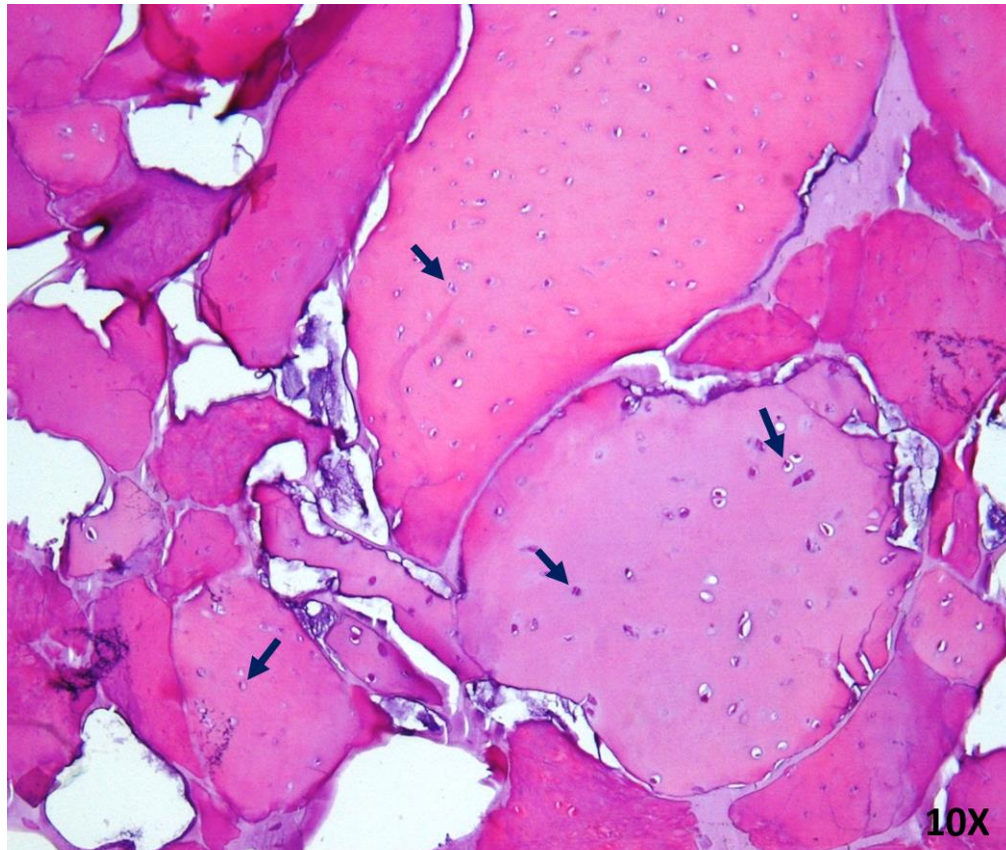


Figura 29. Análisis de migración celular dentro de fase condral.

Estos resultados indican que, a pesar de los poros generados, y las condiciones de cultivo, las cuales permiten la migración de células dentro de todo el andamio, las células pre-diferenciadas se mantienen dentro de la fase condral, específicamente dentro de los fragmentos de matriz de cartílago.

Las células introducidas en el andamio migran y se colocan en los espacios vacíos correspondientes a las lagunas condrales donde se depositaban los condrocitos correspondientes al cartílago nativo antes de ser descelularizado (descelularización completa comprobada por H&E). Las células se presentan

en grupos de 1 y 2 células por laguna, configuración similar a los grupos isógenos encontrados en el cartílago nativo, lo cual evidencia la preferencia de estas células diferenciadas por el material bioactivo de matriz de cartílago descelularizada, adoptando una conformación celular similar a la del tejido de cartílago nativo.

7.4.6.2 Análisis de formación de matriz *de novo*.

La formación de matriz *de novo*, generada por las Ad-MSCs diferenciadas con los esquemas de exposición, fue analizada mediante tinción histológica con H&E a diferentes tiempos de incubación en los andamios.

La tinción de H&E evidencia las zonas correspondientes a la matriz de cartílago añadida como material bioactivo a los andamios 3D (grandes bloques de tejido con lagunas condrocíticas), así como la formación *de novo* de material amorfo de características acidófilas (rosado pálido), el cual incrementa conforme al tiempo de cultivo de las células en los esquemas de exposición, creando un tejido de relleno o tejido de reparación hipocelular el cual une las partículas de la matriz de cartílago, formando un tejido más homogéneo de características similares al cartílago nativo (Figura 30).

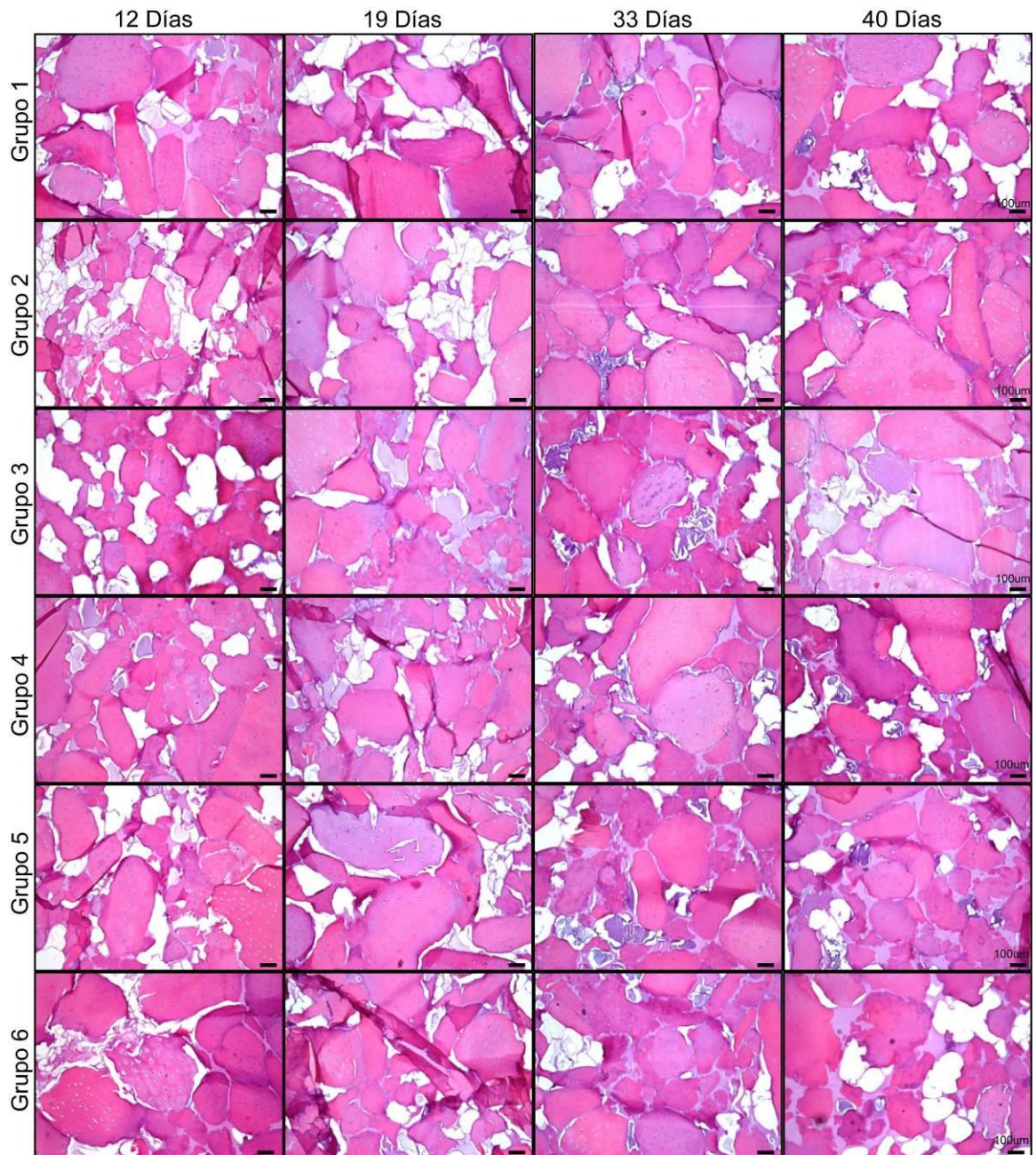


Figura 30. Generación y recambio de matriz extracelular (H&E).

Por su parte, la fibroína utilizada como material adhesivo para mantener unidos los fragmentos de cartílago, generar poros y mantener unidas la fase ósea y de cartílago, presenta una degradación continua con el tiempo,

encontrándose trazas de esta al día 40. Conforme la fibroína comienza su degradación, esta se ve reemplazada por la formación de la matriz extracelular *de novo*, lo cual indica la biodegradabilidad del andamio, el cual se espera sea totalmente degradado y reemplazado por matriz similar al tejido de cartílago nativo al ser usado como implante medico en los pacientes.

No se observa ninguna diferencia significativa en la formación de matriz extracelular entre los grupos de exposición, sin embargo, es necesario analizar las propiedades de la matriz generada.

7.4.6.3 Análisis de formación de colágeno e hipertrofia.

Los niveles de colágeno, así como la calcificación (hipertrofia) de la matriz extracelular generada por las Ad-MSCs, fue analizada mediante tinción histológica con Tricrómico de Masson a los diferentes tiempos de incubación en los soportes tridimensionales.

Mediante la tinción con Tricrómico de Masson se puede observar un recambio en la composición de la matriz extracelular durante el proceso hipertrófico, el cual comienza para la mayoría de los grupos a partir del día 33. El colágeno producido en la matriz extracelular, así como el colágeno perteneciente a la matriz de cartílago comienza a disminuir en intensidad (color azul) conforme el tiempo, mientras que comienza a aumentar la cantidad de matriz teñida por la fucsina escarlata (color rojo), indicando una

remodelación de la matriz extracelular y modificación de la matriz añadida, hacia un tejido de fibrocartílago (Figura 31).

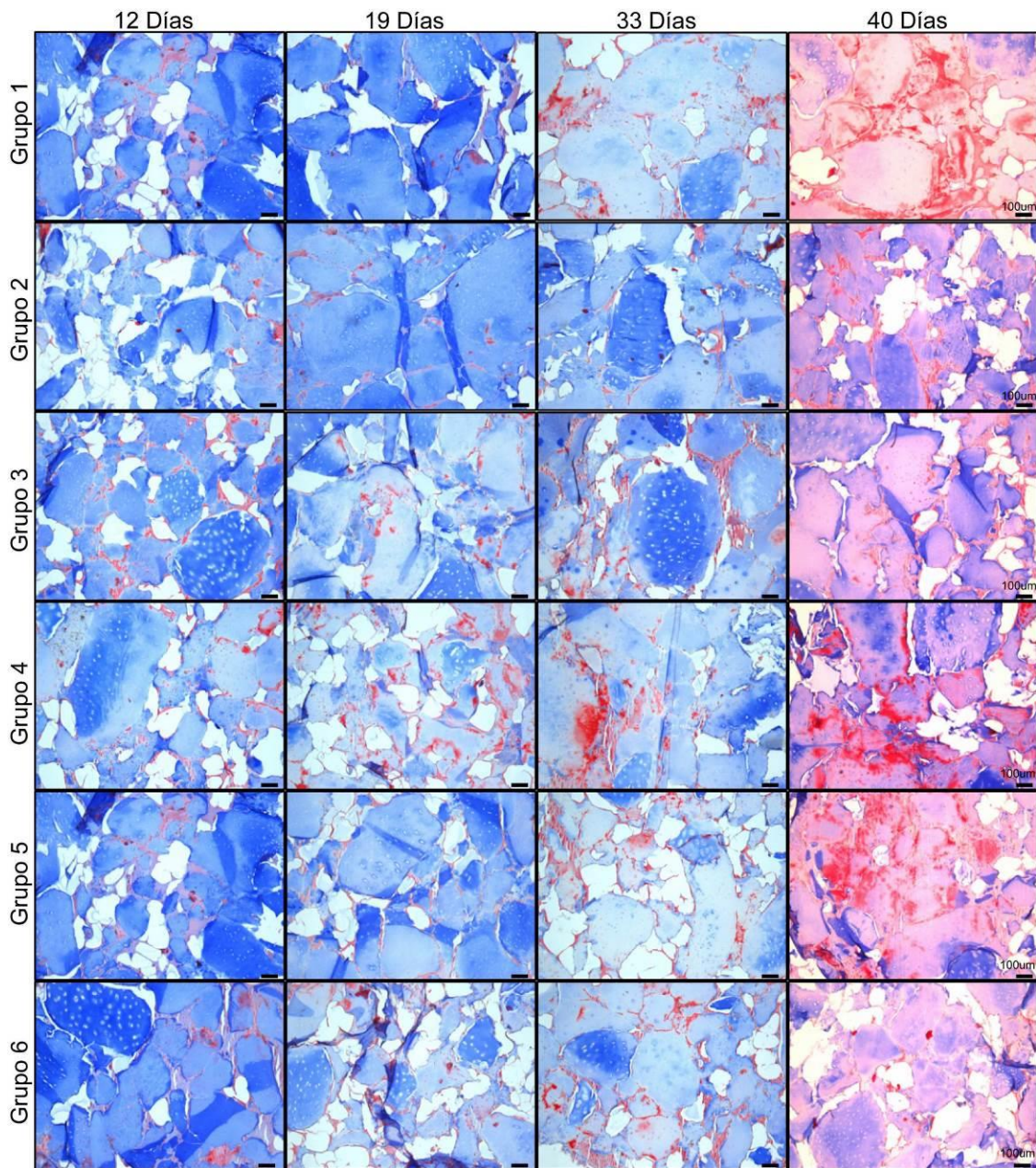


Figura 31. Generación y recambio de matriz extracelular (Tricrómico de Masson).

El grupo 2 (FGF2>IGF1/TGF β 1>TGF- β 1) es el único que mantiene una matriz de colágeno relativamente estable hasta el día 33, con un aparente comienzo de proceso fibrótico poco antes el día 40, mientras que en los grupos 1,3,4,5 y 6 comienza desde los 33 días y a los 40 de observa una escasa cantidad de colágenos y alto nivel de tejido de fibrocartílago.

El grupo 2 no solo mantiene los mejores patrones de expresión de marcadores de expresión de diferenciación condrogénica y disminuidos marcadores de diferenciación hipertrófica, sino que a nivel histológico también conserva sus propiedades hasta el día 33, en comparación con los otros grupos.

Capítulo VIII

Discusión

Las propiedades nativas del cartílago articular, como su característica aneural, alinfática y avascular, así como su baja celularidad generan una deficiente capacidad de regeneración, especialmente ante daños de gran extensión que involucren áreas de cartílago y hueso subcondral. Este tejido se encuentra formado a partir de la matriz celular secretada por los condrocitos, los cuales son células secretoras de matriz extracelular, encargados de la formación del cartílago, sin embargo, después de su maduración progresan a un estado senescente, sin producción de nueva matriz celular, limitando aún más la reparación natural del tejido.

A pesar de ser un tejido generado por un solo linaje celular, y componentes bien caracterizados, el cartílago articular se encuentra formado por múltiples zonas con características celulares, proteicas y arreglo tridimensional diversos, produciendo un tejido complejo, difícil de simular (2,3), y cuyos abordajes clínicos actuales carecen de un efecto a largo plazo, debido a la progresión del tejido reparado hacia un tejido de fibrocartílago el cual carece de las propiedades del tejido de cartílago nativo.

Las condiciones antes descritas generan un verdadero reto médico al tratar de lograr una regeneración estable del daño articular, buscando nuevas alternativas a través de la ingeniería de tejidos y el uso de células troncales.

Las células troncales se encuentran de manera natural en diversos tejidos del organismo y cuentan con la capacidad de diferenciarse hacia linaje condrocítico mediante su estimulación a través de factores de crecimiento, interacciones célula-célula o célula-matriz. Sin embargo, debido a que el cartílago embrionario funciona como un templado temporal para la formación de los huesos largos, los condrocitos formados a partir de células mesenquimales continúan con esta progresión hipertrófica, tratando de generar un tejido óseo en lugar de mantenerse como cartílago estable.

Es por esto que para lograr una diferenciación a un fenotipo estable de condrocitos, es necesaria una combinación precisa de factores condrogénicos y un microambiente condrocítico adecuado, lo cual se logró desarrollar en el presente proyecto, mediante la utilización de esquemas de exposición con factores de crecimiento específicos de la etapa de diferenciación, el uso de concentraciones adecuadas y un microambiente tridimensional con propiedades que estimulen diferenciación y estabilidad de los condrocitos generados.

8.1 Aislamiento y estandarización de cultivo celular Xeno-Free

Se decidió realizar el aislamiento de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (Ad-MSC), ya que el tejido adiposo es uno de los más fácilmente accesibles y del cual se obtiene un número relativamente alto de

células mesenquimales con capacidad de diferenciación, sin problemas de consideración ética (45).

Las células obtenidas mediante nuestro método de aislamiento enzimático presentaron las características necesarias para ser consideradas como células mesenquimales según los criterios de identificación dictados por la Sociedad internacional para Terapia Celular (ISCT)(92), entre los que se encuentran:

- Adherencia al plástico en condiciones normales de cultivo.**
- Expresión de marcadores CD105, CD73, y CD90.**
- No expresión de los marcadores CD45, CD34 ni CD14.**
- Diferenciación a osteoblastos, adipocitos y condrocitos.**

Dichos criterios fueron analizados en colaboración con la Dra. Nidia Karina Moncada Saucedo y la Dra. Vanessa Pérez Silos (93,94).

La capacidad de proliferación de las Ad-MSCs obtenidas fue analizada tanto en suero humano (SH) como suero bovino fetal (SBF), encontrando una mayor capacidad de proliferación al cultivarse en condiciones con SH. El uso de SH permite mantener las células en condiciones de cultivo xeno-free, libres de componentes animales, manteniendo sus características de baja respuesta inmunogénica y disminuido riesgo de rechazo por parte del huésped al no utilizar componentes animales. Los componentes del SBF pueden ocasionar una reacción inmune en el organismo huésped de las células mesenquimales, por lo que el uso de SH permite un mejor abordaje clínico de las células obtenidas. Además de esto, el uso de SBF modifica las

vías de señalización propias de las células mesenquimales, pudiendo modificar la respuesta a la estimulación de las células obtenidas.

8.2 Evaluación de multipotencialidad

A pesar de la identificación mesenquimal de las células obtenidas de tejido adiposo mediante los criterios de la ISCT, se decidió evaluar el estadio indiferenciado de las mismas al pasaje 3, siendo este el mínimo pasaje celular en el cual logramos contar con suficiente número de células para llevar a cabo los experimentos, sin exponer las células a tiempos prolongados de cultivo. Esto es debido a que las células mesenquimales tienden a perder su estadio indiferenciado después de múltiples pasajes por cultivo celular, con lo cual pierden su capacidad de diferenciación (95).

La positividad de los marcadores NANOG, SOX2 y OCT3/4 indican la capacidad multipotencial de las células obtenidas, permitiendo que las mismas puedan ser diferenciadas a los linajes derivados de su capa germinativa. El análisis de SSEA4 se utilizó como control negativo ya que es un marcador específico de células embrionarias las cuales no son encontradas en adultos (42).

Mientras que la expresión de OCT3/4 se observa claramente en el núcleo celular, actuando probablemente como factor de transcripción para regular el estadio indiferenciado de las Ad-MSCs, la presencia de SOX2 parece observarse tanto en núcleo como citoplasma, mientras que NANOG se observa de forma localizada en gránulos dentro del citoplasma. Esto

concuenda con otros autores, donde dichos factores pueden ser encontrados dentro o fuera del núcleo, cumpliendo funciones todavía indefinidas pero aun así ayudando a mantener el estadio indiferenciado de las Ad-MSCs (39).

8.3 Fabricación de andamios bifásicos

El diseño de los andamios bifásicos osteocondrales se llevó a cabo por la Dra. Nidia Karina Moncada Saucedo para su proyecto de tesis (96). Estos andamios cuentan con una fase superior que simula el tejido de cartílago, la cual se encuentra compuesta de fibroína de seda y matriz de cartílago bovino descelularizada, mientras que la fase inferior simula el hueso subcondral y se compone de matriz ósea descelularizada.

La fase de cartílago se llevó a cabo mediante la descelularización de matriz de cartílago bovino mediante el uso de buffers hipotónicos (97,98), siendo estandarizado por la Dra. Moncada (94) para lograr una eficiente remoción del componente celular, mientras conserva sus componentes de matriz de cartílago. La matriz de cartílago descelularizada es un componente bioactivo que ayuda a la recreación del microambiente condral y favorece la diferenciación de las Ad-MSCs al linaje condrocítico. Este material ha demostrado promover migración, adhesión, biocompatibilidad y moléculas de señalización (colágeno tipo II) que ayudan a la diferenciación condrocítica de las células mesenquimales (94,99) y ha sido utilizado por múltiples autores debido a las características antes mencionadas, utilizando matriz de cartílago de res, o cerdo (100). El proceso de descelularización permite una menor

respuesta antigénica, pero que pueden ser reemplazadas por matriz de cartílago humano descelularizado (cadavérico) para disminuir aún más las posibilidades de una reacción de rechazo.

La fibroína de seda, por su parte, es una proteína natural que posee características biofísicas que la hacen adecuada para su uso como parte de un soporte sometido a carga mecánica en múltiples aplicaciones biomédicas y biotecnológicas, con características de compatibilidad biológica, fuerza mecánica, adhesión y biodegradabilidad (100), siendo utilizada, sola o en conjunto con otros materiales para la fabricación de múltiples tipos de andamios para la regeneración de tejido (101).

El andamio bifásico cuenta, además de la fase de cartílago, con una fase inferior de matriz ósea descelularizada (chips de hueso). La descelularización de la matriz ósea se llevó a cabo mediante el uso de agua caliente y peróxido de hidrogeno lo cual permite remover células y componentes proteicos de la matriz ósea (103), con la cual obtuvimos una descelularización del 93% considerada como un porcentaje adecuado para su uso como implante medico (>90%) (102) y se encuentra siendo actualmente utilizada como tratamiento para descelularización de hueso humano para trasplantes por parte del Banco de Hueso y Tejido del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, permitiendo obtener un soporte mineralizado con bajo efecto inmunogénico el cual nos permite soportar la fase condral del andamio en el sitio de la lesión y permite su integración con el tejido adyacente, al mismo tiempo la regeneración del hueso subcondral.

La utilización de andamios bifásicos osteocondrales ha sido explorada por otros autores, como Ding *et al.* Y Ribeiro *et al.* Utilizando materiales similares (fibroína de seda), sin el uso de matriz de cartílago y encontrando que esta combinación de fases es benéfica para el proceso de regeneración y diferenciación condrocítica.

Ambas fases del andamio bifásico, permiten una posible regeneración simultánea de hueso y cartílago (104), generando un microambiente apropiado para la diferenciación de las células mesenquimales en la fase de cartílago. Por su parte, el andamio generado, por sí mismo, posee una resistencia mecánica similar a la del cartílago humano (450-800 kPa) y una correcta integración con el tejido adyacente en modelos porcinos de daño articular (93).

8.4 Exposición secuencial a factores de crecimiento

La diferenciación de células mesenquimales hacia otros linajes celulares, incluyendo condrocitos, es usualmente llevada a cabo mediante el uso de factores de diferenciación, los cuales son moléculas solubles que se unen receptores de membrana y activan las vías de señalización para dirigir la diferenciación hacia el fenotipo deseado (92). Sin embargo, su uso en combinaciones o en exposición secuencial es una metodología poco estudiada.

El mantenimiento de la diferenciación condrogénica es uno de los mayores retos de la ingeniería de cartílago, ya que hasta la fecha no se dispone de una

estrategia que logre una diferenciación estable que pueda ser utilizada para fines clínicos, ya que estas células suelen progresar hacia el proceso hipertrófico.

Para este proyecto se decidió investigar el uso esquemas de diferenciación, con la combinación simultánea y uso secuencial de algunos de los factores de diferenciación más prometedores para lograr una diferenciación condrocítica estable, llevado a cabo en andamios tridimensionales bifásicos que simulan el microambiente condral. Modulando de esta forma el proceso de diferenciación por moléculas solubles y a su vez regular el microambiente celular para tratar de lograr esta estabilidad del fenotipo condrocítico.

Según lo esperado, todos los esquemas probados logran la diferenciación de Ad-MSC hacia un fenotipo similar a condrocitos, sin embargo, existen diferencias entre los grupos según el orden y la concentración de los factores de crecimiento utilizados.

Mediante este abordaje, se logró generar un esquema de diferenciación capaz de generar un fenotipo condrocítico más estable que aquellos obtenidos por los métodos tradicionales de diferenciación mediante una dosis sostenida de un solo factor de crecimiento. Logrando un mantenimiento del fenotipo y matriz celular hasta el día 33 de exposición a los esquemas de diferenciación en el grupo 2 (FGF2>IGF1/TGF β 1>TGF β 1), tanto a nivel de marcadores de ARNm como a nivel histológico.

La utilización de FGF2 en etapa temprana aumento la capacidad de proliferación celular de las Ad-MSC, mientras que se logró utilizar el potencial sinérgico de la combinación simultanea de IGF1 y TGF β 1, como un método

para mejorar la eficiencia de diferenciación (78,105), donde IGF1 promueve la síntesis de matriz extracelular y TGF β 1 ayuda a inhibir el proceso de osificación endocondral (4,80,81).

Se analizó también el mantenimiento de dosis bajas de TGF β 1 (1ng/mL) lo cual ha demostrado inhibir aún más el proceso de osificación endocondral en células en monocapa (4), sin embargo en nuestro modelo, esta concentración es insuficiente para mantener la estimulación condrogénica en el esquema de diferenciación. Esto puede ser debido a posibles causas, como:

- Degradación del factor de crecimiento.
- Falta de difusión al interior del andamio tridimensional.
- Relación entre concentración y cantidad celular insuficiente.

El mantenimiento continuo de una concentración alta de TGF- β 1 (10ng/mL) en el esquema propuesto, logra mantener una alta capacidad de diferenciación condrogénica mientras muestra una disminuida hipertrofia celular, aun bajo tiempos prolongados de cultivo, conservando gran parte de los componentes colágenos, lo que concuerda con lo propuesto por Kim *et al.* (106).

Por su parte, el marcador mesenquimal CD90, el cual se esperaba presentara una disminución conforme se lleva a cabo el proceso de diferenciación (92), mostró un comportamiento diferente a lo esperado, concordando con lo encontrado por Gotterbarm *et al* (35), donde la adición de FGF2 al medio de cultivo altera los patrones de expresión del marcador CD90 en MSCs.

En el presente trabajo se analizó el proceso de diferenciación condrogénica mediante la modulación del microambiente y la estimulación con factores de diferenciación, sin embargo existen algunos otros abordajes que podrían ser explorados a futuro en conjunto con nuestro modelo propuesto, como lo es el uso de estimulación mecánica de los andamios durante su tiempo de cultivo, así como el uso de mecanismos de liberación controlada de los factores de crecimiento en el andamio bifásico (100).

El análisis del proceso de diferenciación condrogénica puede ayudar a entender dicho proceso y la futura experimentación con el uso de factores de crecimiento en esquemas de diferenciación.

Capítulo IX

Conclusiones

- Se logró establecer un método de aislamiento de Ad-MSC altamente eficiente, en condiciones xeno-free, con un alto rendimiento en la obtención de células y con características adecuadas para su uso clínico.
- El cultivo celular aislado y expandido, muestra los marcadores de pluripotencialidad OCT3/4, SOX2 y NANOG, demostrando que las células aisladas mantienen su estadio indiferenciado durante el pasaje utilizado para su diferenciación.
- Se logró realizar la construcción de andamios bifásicos osteocondrales, con una fase ósea que brinda soporte a la fase condral; la cual emula el microambiente propio de los condrocitos nativos y posee resistencia mecánica a la compresión.
- Se estableció un esquema de uso de factores de crecimiento (FGF2(10ng/mL)>IGF1(100ng/mL)/TGFβ1(10ng/mL)>TGFβ1(10ng/mL) el cual permite generar una eficiente condrogénesis y una disminuida progresión hipertrófica, aunado al uso de cultivo en andamio bifásico 3D el cual permite el establecimiento de las células y su uso como implante para lesiones osteocondrales, con cualidades apropiadas para la utilización clínica del modelo estudiado.

Capítulo X

Referencias

1. **Bhattacharjee M, Coburn J, Centola M, *et al.*: Tissue engineering strategies to study cartilage development, degeneration and regeneration. Adv Drug Deliv Rev 84: 107–122, 2015.**
2. **Carballo CB, Nakagawa Y, Sekiya I and Rodeo SA: Basic Science of Articular Cartilage. Clin Sports Med 36: 413–425, 2017.**
3. **Zhang L, Hu J and Athanasiou KA: The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. Crit Rev Biomed Eng 37: 1–57, 2009.**
4. **Demoor M, Ollitrault D, Gomez-Leduc T, *et al.*: Cartilage tissue engineering: Molecular control of chondrocyte differentiation for proper cartilage matrix reconstruction. Biochim Biophys Acta - Gen Subj 1840: 2414–2440, 2014.**
5. **Toh WS, Foldager CB, Pei M and Hui JHP: Advances in Mesenchymal Stem Cell-based Strategies for Cartilage Repair and Regeneration. Stem Cell Rev Reports 10: 686–696, 2014.**

6. Krüger JP, Hondke S, Lau S and Endres M: Characterization of plasma fibronectin for migration, proliferation, and differentiation on human articular chondrocytes. *J Tissue Eng Regen Med* 13: 537–545, 2019.
7. Song EK, Jeon J, Jang DG, *et al.*: ITGBL1 modulates integrin activity to promote cartilage formation and protect against arthritis. *Sci Transl Med* 10: eaam7486, 2018.
8. Sanchez Naranjo Julio César: Fisiología del condrocito articular. *Rev Colomb Reumatol* 15: 21–33, 2008.
9. Nazempour A and Van Wie BJ: Chondrocytes, Mesenchymal Stem Cells, and Their Combination in Articular Cartilage Regenerative Medicine. *Ann Biomed Eng* 44: 1325–1354, 2016.
10. Stanton L, Underhill TM and Beier F: MAP kinases in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 263: 165–175, 2003.
11. Decker RS: Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol* 62: 50–56, 2017.
12. Lefebvre V, Angelozzi M and Haseeb A: SOX9 in cartilage development and disease. *Curr Opin Cell Biol* 61: 39–47, 2019.
13. Kwon H, Paschos NK, Hu JC and Athanasiou K: Articular cartilage tissue engineering: the role of signaling molecules. *Cell Mol Life Sci* 73: 1173–1194, 2016.
14. Naranjo JCS and Zapata DFL: Fisiopatología celular de la osteoartritis:

- el condrocito articular como protagonista. *Iatreia* 24: 167–178, 2011.
15. Loeser RF: Integrins and chondrocyte–matrix interactions in articular cartilage. *Matrix Biol* 39: 11–16, 2014.
 16. Komori T: Cell Death in Chondrocytes, Osteoblasts, and Osteocytes. *Int J Mol Sci* 17: 2045, 2016.
 17. Aigner T, Söder S, Gebhard PM, McAlinden A and Haag J: Mechanisms of Disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3: 391–399, 2007.
 18. Musumeci G, Mobasher A, Trovato FM, *et al.*: Biosynthesis of collagen I, II, RUNX2 and lubricin at different time points of chondrogenic differentiation in a 3D in vitro model of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Acta Histochem* 116: 1407–1417, 2014.
 19. Medvedeva E, Grebenik E, Gornostaeva S, Telpuhov V, Lychagin A, Timashev P and Chagin A: Repair of Damaged Articular Cartilage: Current Approaches and Future Directions. *Int J Mol Sci* 19: 2366, 2018.
 20. Walker JM: *Mesenchymal Stem Cells*. (Gnecchi M (ed.)). Springer New York, New York, NY, 2016.
 21. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC and Athanasiou KA: Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage. *Nat Rev Rheumatol* 11: 21–34, 2015.

22. Li YY, Cheng HW, Cheung KMC, Chan D and Chan BP: Mesenchymal stem cell-collagen microspheres for articular cartilage repair: Cell density and differentiation status. *Acta Biomater* 10: 1919–1929, 2014.
23. Delanois RE, Etcheson JI, Sodhi N, Henn RF, Gwam CU, George NE and Mont MA: Biologic Therapies for the Treatment of Knee Osteoarthritis. *J Arthroplasty* 34: 801–813, 2019.
24. Gadjanski I, Spiller K and Vunjak-Novakovic G: Time-Dependent Processes in Stem Cell-Based Tissue Engineering of Articular Cartilage. *Stem Cell Rev Reports* 8: 863–881, 2012.
25. Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W and Józkowicz A: Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol* 62: 329–337, 2015.
26. Murphy KC, Whitehead J, Falahee PC, Zhou D, Simon SI and Leach JK: Multifactorial Experimental Design to Optimize the Anti-Inflammatory and Proangiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cell Spheroids. *Stem Cells* 35: 1493–1504, 2017.
27. Hamid T and Prabhu SD: Immunomodulation Is the Key to Cardiac Repair. *Circ Res* 120: 1530–1532, 2017.
28. Agudo J, Park ES, Rose SA, *et al.*: Quiescent Tissue Stem Cells Evade Immune Surveillance. *Immunity* 48: 271-285.e5, 2018.
29. Lo Sicco C, Reverberi D, Balbi C, *et al.*: Mesenchymal Stem Cell-Derived

**Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects:
Endorsement of Macrophage Polarization. Stem Cells Transl Med 6:
1018–1028, 2017.**

- 30. Redondo-Castro E, Cunningham C, Miller J, *et al.*: Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. Stem Cell Res Ther 8: 79, 2017.**
- 31. Karp JM and Leng Teo GS: Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. Cell Stem Cell 4: 206–216, 2009.**
- 32. Zachar L, Bačenková D and Rosocha J: Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. J Inflamm Res Volume 9: 231–240, 2016.**
- 33. ClinicalTrials.gov [Internet].**
- 34. Krinner A and Roeder I: Quantification and Modeling of Stem Cell–Niche Interaction. vol. 844, pp11–36, 2014.**
- 35. Hagmann S, Moradi B, Frank S, Dreher T, Kämmerer PW, Richter W and Gotterbarm T: FGF-2 addition during expansion of human bone marrow-derived stromal cells alters MSC surface marker distribution and chondrogenic differentiation potential. Cell Prolif 46: 396–407, 2013.**
- 36. Fuentes-Mera L, Camacho A, Moncada-Saucedo NK and Peña-Martínez V: Current Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering. In: Mesenchymal Stem Cells - Isolation, Characterization**

and Applications. InTech, pp1–20, 2017.

37. Haghighi F, Dahlmann J, Nakhaei-Rad S, *et al.*: bFGF-mediated pluripotency maintenance in human induced pluripotent stem cells is associated with NRAS-MAPK signaling. *Cell Commun Signal* 16: 96, 2018.
38. Zhang W, Sui Y, Ni J and Yang T: Insights into the Nanog gene: A propeller for stemness in primitive stem cells. *Int J Biol Sci* 12: 1372–1381, 2016.
39. van Schaijik B, Davis PF, Wickremesekera AC, Tan ST and Itinteang T: Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: a review. *J Clin Pathol* 71: 88–91, 2018.
40. Pan G and Thomson JA: Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17: 42–49, 2007.
41. Zhang S: Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells* 6: 305, 2014.
42. Lv F-J, Tuan RS, Cheung KMC and Leung VYL: Concise Review: The Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 32: 1408–1419, 2014.
43. Xian C and Bruce F: Repair of Injured Articular and Growth Plate Cartilage Using Mesenchymal Stem Cells and Chondrogenic Gene Therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 1: 213–229, 2006.

44. Somoza RA, Welter JF, Correa D and Caplan AI: Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells: Challenges and Unfulfilled Expectations. *Tissue Eng Part B Rev* 20: 596–608, 2014.
45. Argentati C, Morena F, Bazzucchi M, Armentano I, Emiliani C and Martino S: Adipose Stem Cell Translational Applications: From Bench-to-Bedside. *Int J Mol Sci* 19: 3475, 2018.
46. Fujii S, Miura Y, Iwasa M, *et al.*: Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells. *J Clin Exp Hematop* 57: 1–8, 2017.
47. Lee CSD, Watkins E, Burns OA, Schwartz Z and Boyan BD: Tailoring Adipose Stem Cell Trophic Factor Production with Differentiation Medium Components to Regenerate Chondral Defects. *Tissue Eng Part A* 19: 1451–1464, 2013.
48. Stromps J-P, Paul NE, Rath B, Nourbakhsh M, Bernhagen J and Pallua N: Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells: A New Path in Articular Cartilage Defect Management? *Biomed Res Int* 2014: 1–7, 2014.
49. Yao Y and Wang C: Dedifferentiation: inspiration for devising engineering strategies for regenerative medicine. *npj Regen Med* 5: 14, 2020.
50. Cicione C, Muiños-López E, Hermida-Gómez T, Fuentes-Boquete I, Díaz-Prado S and Blanco FJ: Alternative protocols to induce chondrogenic

differentiation: transforming growth factor- β superfamily. *Cell Tissue Bank* 16: 195–207, 2015.

51. Zhou N, Li Q, Lin X, *et al.*: BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cell Tissue Res* 366: 101–111, 2016.
52. Sheykhhasan M, Qomi RT and Ghiasi M: Fibrin Scaffolds Designing in order to Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Differentiation to Chondrocytes in the Presence of TGF- β 3. *Int J Stem Cells* 8: 219–227, 2015.
53. Solchaga LA, Penick KJ and Welter JF: Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks. In: *Methods in Molecular Biology*. vol. 150 Clifton, pp253–278, 2011.
54. Zuo Q, Cui W, Liu F, Wang Q, Chen Z and Fan W: Co-cultivated mesenchymal stem cells support chondrocytic differentiation of articular chondrocytes. *Int Orthop* 37: 747–752, 2013.
55. Yan B, Zhang Z, Jin D, *et al.*: mTORC1 regulates PTHrP to coordinate chondrocyte growth, proliferation and differentiation. *Nat Commun* 7: 11151, 2016.
56. Tchetina E V and Markova GA: Regulation of energy metabolism in the growth plate and osteoarthritic chondrocytes. *Rheumatol Int* 38: 1963–1974, 2018.

57. Zhong L, Huang X, Karperien M and Post J: The Regulatory Role of Signaling Crosstalk in Hypertrophy of MSCs and Human Articular Chondrocytes. *Int J Mol Sci* 16: 19225–19247, 2015.
58. Hata K, Takahata Y, Murakami T and Nishimura R: Transcriptional Network Controlling Endochondral Ossification. *J Bone Metab* 24: 75, 2017.
59. Tamer A.E. A and Maxwell T. H: Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histol Histopathol* 29, 2014.
60. Wagner ER, Parry J, Dadsetan M, *et al.*: Chondrocyte Attachment, Proliferation, and Differentiation on Three-Dimensional Polycaprolactone Fumarate Scaffolds. *Tissue Eng Part A* 23: 622–629, 2017.
61. Ohba S, Hojo H and Chung U: Bioactive factors for tissue regeneration: state of the art. *Muscles Ligaments Tendons J* 2: 193–203, 2012.
62. Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, *et al.*: Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs. *Sci Rep* 10: 14996, 2020.
63. Xie Y, Liu X, Wang S, Wang M and Wang G: Proper mechanical stimulation improve the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Improve the viscoelasticity and chondrogenic phenotype. *Biomed Pharmacother* 115: 108935, 2019.

64. Portron S, Hivernaud V, Merceron C, *et al.*: Inverse Regulation of Early and Late Chondrogenic Differentiation by Oxygen Tension Provides Cues for Stem Cell-Based Cartilage Tissue Engineering. *Cell Physiol Biochem* 35: 841–857, 2015.
65. Gugjoo M, Amarpal, Sharma G, Aithal H and Kinjavdekar P: Cartilage tissue engineering: Role of mesenchymal stem cells along with growth factors & scaffolds. *Indian J Med Res* 144: 339, 2016.
66. Woods A, Wang G and Beier F: Regulation of chondrocyte differentiation by the actin cytoskeleton and adhesive interactions. *J Cell Physiol* 213: 1–8, 2007.
67. Liu C-F, Samsa WE, Zhou G and Lefebvre V: Transcriptional control of chondrocyte specification and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 62: 34–49, 2017.
68. Hellingman CA, Koevoet W and van Osch GJVM: Can one generate stable hyaline cartilage from adult mesenchymal stem cells? A developmental approach. *J Tissue Eng Regen Med* 6: e1–e11, 2012.
69. Danišovič L, Varga I and Polák Š: Growth factors and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* 44: 69–73, 2012.
70. Almalki SG and Agrawal DK: Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 92: 41–51, 2016.

71. Zhong J, Guo B, Xie J, *et al.*: Crosstalk between adipose-derived stem cells and chondrocytes: When growth factors matter. *Bone Res* 4: 15036, 2016.
72. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J and Suchorska W: The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration. *Int Orthop* 39: 995–1003, 2015.
73. Huang AH, Motlekar NA, Stein A, Diamond SL, Shore EM and Mauck RL: High-Throughput Screening for Modulators of Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis. *Ann Biomed Eng* 36: 1909–1921, 2008.
74. Xie Y, Su N, Yang J, *et al.*: FGF/FGFR signaling in health and disease. *Signal Transduct Target Ther* 5: 181, 2020.
75. Kabiri A, Esfandiari E, Hashemibeni B, Kazemi M, Mardani M and Esmaeili A: Effects of FGF-2 on human adipose tissue derived adult stem cells morphology and chondrogenesis enhancement in Transwell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 424: 234–238, 2012.
76. Correa D, Somoza RA, Lin P, *et al.*: Sequential exposure to fibroblast growth factors (FGF) 2, 9 and 18 enhances hMSC chondrogenic differentiation. *Osteoarthr Cartil* 23: 443–453, 2015.
77. Pei M: Environmental preconditioning rejuvenates adult stem cells' proliferation and chondrogenic potential. *Biomaterials* 117: 10–23, 2017.
78. Zhou Q, Li B, Zhao J, Pan W, Xu J and Chen S: IGF-I induces adipose

derived mesenchymal cell chondrogenic differentiation in vitro and enhances chondrogenesis in vivo. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* 52: 356–364, 2016.

79. Kim Y Il, Ryu J-S, Yeo JE, Choi YJ, Kim YS, Ko K and Koh Y-G: Overexpression of TGF- β 1 enhances chondrogenic differentiation and proliferation of human synovium-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 450: 1593–1599, 2014.
80. van Caam A, Blaney Davidson E, Garcia de Vinuesa A, *et al.*: The high affinity ALK1-ligand BMP9 induces a hypertrophy-like state in chondrocytes that is antagonized by TGF β 1. *Osteoarthr Cartil* 23: 985–995, 2015.
81. Grafe I, Alexander S, Peterson JR, Snider TN, Levi B, Lee B and Mishina Y: TGF- β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10: a022202, 2018.
82. Tao K, Frisch J, Rey-Rico A, *et al.*: Co-overexpression of TGF- β and SOX9 via rAAV gene transfer modulates the metabolic and chondrogenic activities of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 7: 20, 2016.
83. Shi S, Wang C, Acton AJ, Eckert GJ and Trippel SB: Role of Sox9 in Growth Factor Regulation of Articular Chondrocytes. *J Cell Biochem* 116: 1391–1400, 2015.
84. Wang X, Li Y, Han R, *et al.*: Demineralized Bone Matrix Combined Bone

Marrow Mesenchymal Stem Cells, Bone Morphogenetic Protein-2 and Transforming Growth Factor- β 3 Gene Promoted Pig Cartilage Defect Repair. PLoS One 9: e116061, 2014.

- 85. Solorio LD, Dhami CD, Dang PN, Vieregge EL and Alsberg E: Spatiotemporal Regulation of Chondrogenic Differentiation with Controlled Delivery of Transforming Growth Factor- β 1 from Gelatin Microspheres in Mesenchymal Stem Cell Aggregates. Stem Cells Transl Med 1: 632–639, 2012.**
- 86. Lian C, Wang X, Qiu X, *et al.*: Collagen type II suppresses articular chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis progression by promoting integrin β 1–SMAD1 interaction. Bone Res 7: 8, 2019.**
- 87. Yang HJ, Kim KJ, Kim MK, *et al.*: The stem cell potential and multipotency of human adipose tissue-derived stem cells vary by cell donor and are different from those of other types of stem cells. Cells Tissues Organs 199: 373–383, 2014.**
- 88. Desai N, Rambhia P and Gishto A: Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. Reprod Biol Endocrinol 13: 9, 2015.**
- 89. Heger JI, Froehlich K, Pastuschek J, *et al.*: Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum. Exp Cell Res 365: 57–65, 2018.**
- 90. Rizzino A and Wuebben EL: Sox2/Oct4: A delicately balanced**

partnership in pluripotent stem cells and embryogenesis. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* 1859: 780–791, 2016.

91. Barraud P, Stott S, Møllgård K, Parmar M and Björklund A: In vitro characterization of a human neural progenitor cell coexpressing SSEA4 and CD133. *J Neurosci Res* 85: 250–259, 2007.
92. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.*: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315–317, 2006.
93. Pérez-Silos V, Moncada-Saucedo NK, Peña-Martínez V, *et al.*: A Cellularized Biphasic Implant Based on a Bioactive Silk Fibroin Promotes Integration and Tissue Organization during Osteochondral Defect Repair in a Porcine Model. *Int J Mol Sci* 20: 5145, 2019.
94. Moncada-Saucedo NK, Marino-Martínez IA, Lara-Arias J, *et al.*: A Bioactive Cartilage Graft of IGF1-Transduced Adipose Mesenchymal Stem Cells Embedded in an Alginate/Bovine Cartilage Matrix Tridimensional Scaffold. *Stem Cells Int* 2019: 1–15, 2019.
95. Yang Y-HK, Ogando CR, Wang See C, Chang T-Y and Barabino GA: Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther* 9: 131, 2018.
96. Moncada-Saucedo NK: Diseño y evaluación in vitro de un implante bifásico bioactivo para la reparación de defectos osteocondrales., 2019.

97. Tavassoli A, Mahdavi-shahri N and Matin MM: Bovine articular cartilage decellularized matrix as a scaffold for use in cartilage tissue engineering. Iran J Vet Sci Technol 4: 1–8, 2012.
98. Luo L, Eswaramoorthy R, Mulhall KJ and Kelly DJ: Decellularization of porcine articular cartilage explants and their subsequent repopulation with human chondroprogenitor cells. J Mech Behav Biomed Mater 55: 21–31, 2016.
99. Xia C, Mei S, Gu C, *et al.*: Decellularized cartilage as a prospective scaffold for cartilage repair. Mater Sci Eng C 101: 588–595, 2019.
100. Yang Q, Teng B-H, Wang L-N, *et al.*: Silk fibroin/cartilage extracellular matrix scaffolds with sequential delivery of TGF- β 3 for chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells. Int J Nanomedicine Volume 12: 6721–6733, 2017.
101. Ribeiro VP, da Silva Moraes A, Maia FR, *et al.*: Combinatory approach for developing silk fibroin scaffolds for cartilage regeneration. Acta Biomater 72: 167–181, 2018.
102. Gilpin A and Yang Y: Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. Biomed Res Int 2017, 2017.
103. Karalashvili L, Chichua N, Menabde G, *et al.*: Decellularized Bovine Bone Graft for Zygomatic Bone Reconstruction. Med Case Reports 04: 1–5, 2018.

104. Ding X, Zhu M, Xu B, *et al.*: Integrated Trilayered Silk Fibroin Scaffold for Osteochondral Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *ACS Appl Mater Interfaces* 6: 16696–16705, 2014.
105. Worster AA, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J and Nixon AJ: Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. *J Orthop Res* 19: 738–749, 2001.
106. Kim H-J, Kim Y-J and Im G-I: Is Continuous Treatment with Transforming Growth Factor-Beta Necessary to Induce Chondrogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells? *Cells Tissues Organs* 190: 1–10, 2009.
107. Gadjanski I and Vunjak-Novakovic G: Challenges in engineering osteochondral tissue grafts with hierarchical structures. *Expert Opin Biol Ther* 15: 1583–1599, 2015.
108. Raynaud CM, Ahmad FS, Allouba M, Abou-Saleh H, Lui KO and Yacoub M: Reprogramming for cardiac regeneration. *Glob Cardiol Sci Pract* 2014: 44, 2014.
109. Takizawa P: Histology.
110. van der Kraan PM and van den Berg WB: Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthr Cartil* 20: 223–232, 2012.

- 111. Fuentes-Mera L, Camacho A, Moncada-Saucedo NK and Peña-Martínez V: Current Applications of Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Tissue Engineering. In: Mesenchymal Stem Cells - Isolation, Characterization and Applications. InTech, 2017.**

Capítulo XI

Anexos

Anexo I. Condiciones de cultivo celular de las líneas Ad-MSK

Composición medio DMEM suplementado:

- Medio DMEM.
- Suero humano (10%).
- Penicilina/Estreptomicina (100U/mL y 100µg/mL).

Procedimiento de descongelamiento:

- 1- Descongelamiento del vial con las células en baño de agua a 37°C.
- 2- Centrifugar el vial a 600xg y desechar el sobrenadante para eliminar el DMSO.
- 3- Resuspender las células en 1mL de medio DMEM suplementado y colocarlo en un frasco de cultivo de 25cm².
- 4- Añadir 5mL del medio de cultivo al frasco con la suspensión de células.
- 5- Incubar a 37°C con una atmosfera al 5% de CO₂.
- 6- Realizar la observación diaria de la línea celular y verificar su adherencia a la placa.

- 7- Una vez adheridas realizar el cambio de medio cada aproximadamente cada 48h según la confluencia de las células.

Procedimiento de cambio de medio:

- 1- Retirar todo el medio viejo de cada frasco de cultivo con una pipeta y desecharlo.
- 2- Añadir 6mL de medio DMEM suplementado nuevo a cada frasco.
- 3- Incubar a 37°C y 5% de CO₂ hasta confluencia mayor o igual al 80%.

Procedimiento de resiembra (Confluencia mayor o igual al 80%):

- 1- Retirar por completo el medio viejo de cada frasco de cultivo y desecharlo.
- 2- Añadir 2mL de solución de tripsina/EDTA a cada frasco de cultivo, homogeneizar suavemente por agitación e incubar a 37°C por 5 min.
- 3- Asegurar la resuspensión de todas las células rociando el interior del frasco de cultivo con la misma solución de tripsina de la placa varias veces.
- 4- Tomar la solución de tripsina con las células y transferirla a un tubo de 15mL.
- 5- Añadir la misma cantidad de medio DMEM suplementado que la cantidad de tripsina recolectada en el tubo de 15mL, para realizar la neutralización de la tripsina.

- 6- Homogenizar perfectamente subiendo y bajando el líquido con una pipeta, al menos 15 veces.
- 7- Centrifugar a 2000xg por 5 minutos.
- 8- Desechar el sobrenadante sin resuspender el botón celular.
- 9- Resuspender el botón celular en medio DMEM suplementado, dependiendo de la cantidad de células que se deseen sembrar.
- 10- Añadir un volumen determinado a cada frasco de cultivo y adicionar DMEM suficiente para cubrir por completo el fondo del frasco de cultivo
- 11- Incubar a 37°C y 5% de CO₂.

Procedimiento de cuenta de número de células:

- 1- Homogenizar perfectamente la suspensión de células previamente tripsinizadas y neutralizadas.
- 2- Tomar 10µL de la suspensión y transferirlos a un tubo de 0.2mL
- 3- Añadir al tubo 60µL de medio DMEM suplementado, sin células.
- 4- Añadir al tubo 10µL de azul de tripano y homogenizar la mezcla subiendo y bajando el líquido con micropipeta al menos 20 veces.
- 5- Tomar 10µL de la mezcla y depositarlo en una cámara de Neubauer con cubre hematímetro por capilaridad.
- 6- Contar en los 4 cuadrantes de glóbulos blancos y obtener el promedio.

7- Realizar la siguiente formula: (Promedio X 8 (dilución) X 10,000) = células/mL.

Procedimiento de congelamiento de línea celular:

- 1- Despegar las células del frasco de cultivo utilizando una solución de tripsina/EDTA e incubando a 37°C por 5 minutos.**
- 2- Transferir las células resuspendidas a un tubo de 15mL.**
- 3- Añadir una cantidad equivalente de medio DMEM suplementado a la cantidad de tripsina en el tubo de 15mL.**
- 4- Centrifugar a 2000xg por 5min.**
- 5- Descartar el sobrenadante sin resuspender el botón de células.**
- 6- Resuspender el botón celular en 1.8mL de suero bovino fetal y 0.2mL de DMSO.**
- 7- Añadir 1mL de la suspensión de celular a cada criovial.**
- 8- Congelar las células en el criovial directamente a -80°C, o congelarlas a -20°C por 24h y después pasarlas a un contenedor de nitrógeno líquido.**

Anexo II. Tinción histológica de Hematoxilina & Eosina (H&E)

- 1. Una vez desparafinados y rehidratados los cortes se colocan en solución de hematoxilina por 2 min.**
- 2. Realizar dos lavados con agua potable y agua destilada.**
- 3. Hacer una inmersión rápida en alcohol ácido**
- 4. Lavar dos veces con agua potable y agua destilada.**
- 5. Sumergir 2 veces las laminillas en agua amoniacal.**
- 6. Enjuague lento con agua potable y agua destilada.**
- 7. Hacer 6 inmersiones rápidas en colorante eosina.**
- 8. Deshidratar en etanol al 96%, etanol absoluto, etanol-xilol por 15 s cada uno.**
- 9. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.**

Anexo III. Tinción histológica de Tricrómico de Masson

- 1. Una vez desparafinados e hidratados los cortes se colocan en solución de Bouin durante toda la noche a temperatura ambiente.**
- 2. Lavar las laminillas con agua potable hasta que desaparezca el color amarillo y enjuagar con agua destilada.**
- 3. Teñir los núcleos con hematoxilina férrica de Geiger por 10 min.**
- 4. Lavar con agua potable por 5 min, y enjuagar con agua destilada.**
- 5. Teñir en solución de fucsina/escarlata por 10s.**
- 6. Lavar en agua destilada hasta que deje de teñirse.**
- 7. Sumergir en solución de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico por 10 min.**
- 8. Enjuagar brevemente en agua destilada.**
- 9. Teñir con azul de anilina por 2 min.**
- 10. Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.**
- 11. Hacer una inmersión de 15 s en ácido acético acuso al 1%.**
- 12. Deshidratar en etanol al 96%, etanol absoluto, etanol-xilol por 15 s cada uno.**
- 13. Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 s cada uno y montar con resina.**

Capítulo XII

Apéndices

Apéndice I. Producción científica durante el programa de doctorado

Expositor.

- **DECELLULARIZED BOVINE BONE CHIPS AS A POTENTIAL BIOLOGIC SCAFFOLD** en el “XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, México, 2018.

Publicaciones.

- Bermudez-Reyes B, Lara-Banda M, Reyes-Zarate E, Rojas-Martínez A, Camacho A, Moncada-Saucedo N, Pérez-Silos V, García-Ruiz A, Guzmán-López A, Peña-Martínez V, Lara-Arias J, Torres-Méndez S, Fuentes-Mera L. “EFFECT ON GROWTH AND OSTEOBLAST MINERALIZATION OF HYDROXYAPATITE-ZIRCONIA (HA-ZRO₂) OBTAINED BY A NEW LOW TEMPERATURE SYSTEM”. *Biomedical Materials*, 2017; 13(3):035001.
- Nidia K Moncada-Saucedo, Iván A Marino-Martínez, Jorge Lara-Arias, Víktor J Romero-Díaz, Alberto Camacho, Arcadio Valdés-Franco, Vanessa Pérez-Silos, Alejandro García-Ruiz, Hang Lin, Rocky Tuan, Rosalío Ramos-Payán, María del Refugio Lara-Banda, Rocío Ortiz-López, Augusto Rojas-Martínez and Lizeth Fuentes-Mera. “A BIOACTIVE CARTILAGE GRAFT OF IGF1 TRANSDUCED ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS EMBEDDED IN A ALGINATE/BOVINE CARTILAGE MATRIX TRIDIMENSIONAL SCAFFOLD”. *Stem Cells International*, 1–15, 2019.
- Vanessa Pérez-Silos, Nidia K Moncada-Saucedo, Víktor Peña-Martínez, Jorge Lara-Arias, Iván A Marino-Martínez, Alberto Camacho, Víktor J Romero-Díaz, María Lara Banda, Alejandro García-Ruiz, Adolfo Soto-Domínguez, Humberto Rodríguez-Rocha, Norberto López-Serna, Rocky S Tuan, Hang Lin, Lizeth Fuentes-Mera. “A CELLULARIZED BIPHASIC IMPLANT BASED ON A BIOACTIVE SILK FIBROIN PROMOTES INTEGRATION AND TISSUE ORGANIZATION DURING OSTEOCHONDRAL DEFECT REPAIR IN A PORCINE MODEL”. *International journal of molecular sciences*, 2019; 20(20):5145.
- Alejandro García-Ruiz, Celia N. Sánchez-Domínguez, Nidia K. Moncada-Saucedo, Vanessa Pérez-Silos, Jorge Lara-Arias, Iván A Marino-Martínez, Alberto Camacho, Víktor J. Romero-Díaz, Víktor Peña-Martínez, Rosalío Ramos-Payán, Rocky S. Tuan, Hang Lin, Lizeth Fuentes-Mera, Ana María Rivas-Estilla. **SEQUENTIAL GROWTH FACTORS EXPOSURE OF HUMAN AD-MSCS IMPROVES CHONDROGENIC DIFFERENTIATION IN AN OSTEOCHONDRAL BIPHASIC IMPLANT**. *Experimental and therapeutic medicine*. En revisión.

Apéndice II. Currículum

PERSONAL INFORMATION

Name: Alejandro García Ruiz.

Date of birth: October 28, 1989.

Email address: alexgruiz@hotmail.com

EDUCATION

2015-Current: PhD program in Molecular Biology and Genetic Engineering, by the Biochemistry and Molecular Medicine Department, School of Medicine, Autonomous University of Nuevo Leon, Mexico.

2013-2015: Master in Science, in Molecular Biology and Genetic Engineering, by the Biochemistry and Molecular Medicine Department, School of Medicine, Autonomous University of Nuevo Leon, Mexico.

2008-2013: Pharmaceutical Biological Chemist by the School of Chemical Sciences, Autonomous University of Nuevo Leon, Mexico.

LABORATORY EXPERIENCE

- Nucleic acids (DNA and RNA) extraction and analysis techniques.
- Recombinant protein expression and purification.
- PCR, RT-PCR, qPCR.
- CGH and Expression microarrays (Agilent).
- Western blot.
- Animal experimentation models.
- Tissue processing for histological techniques.
- Immunohistochemistry and Immunofluorescence.
- Microscopy.
- Cell line and primary culture.
- Mesenchymal stem cells isolation, culture, and differentiation.
- Evaluation and interpretation of experimental and clinical data.
- Next Generation Sequencing (Illumina).

CONFERENCES

- **Alejandro García Ruiz**, Irma Guadalupe Domínguez Vigil, Angel Anastasio Saucedo Vélez, Luis Enrique Hernández Mata, Leslie Lisset Infante Martínez, Oscar Sergio López Navarro, Miguel Angel Martínez García, Oscar Iván Torres Arriaga, Xristo Zárate Kalfópulos, Ulrico Javier López Chukén. **"QUANTIFICATION OF LEAD IN POPULAR CANDIES OF THE METROPOLITAN AREA OF MONTERREY, NUEVO LEON"** in the "International Congress of Pharmaceutical Biology Chemists", Mexico, 2011.
- **Alejandro García Ruiz**, Ilse Delint Ramírez, Ana María Guadalupe Rivas Estilla, Román Vidal Tamayo, Viviana Chantal Zomosa Signoret, Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez, Carlos Córdova Fletes. **"TRANSCRIPTIONAL PROFILE AND SIGNALING PATHWAYS AFFECTED BY THE INHIBITION OF PRR12"** in the "XXVIII National Congress of Medicine Research", Mexico, 2016.
- **Alejandro García Ruiz**, Nidia Karina Moncada Saucedo, Vanessa Pérez Silos, Lizeth Alicia Fuentes Mera. **"DECELLULARIZED BOVINE BONE CHIPS AS A POTENTIAL BIOLOGIC SCAFFOLD"** in the "XXXII Nacional Congress of Biochemistry", Mexico, 2018.
- Moncada-Saucedo NK, **García-Ruiz A**, Pérez-Silos V, Camacho-Morales A, Lara-Arias J, Romero-Díaz VJ, Castro-Govea Y, Coronado-Cerda EE, Cortés-Álvarez CD, Torres-González V, Yáñez-

Caballero M, Tuan RS, Vilchez-Cavazos F, Marino-Martínez I, Fuentes-Mera L **“SILK FIBROIN/CARTILAGE MATRIX BIPHASIC SCAFFOLD, A SUITABLE ENVIRONMENT FOR HADSCS FOR OSTEOCHONDRAL TISSUE ENGINEERING”** in the “Miami Winter Symposium – Stem Cells”, USA, 2018.

BIBLIOGRAPHY

- **Alejandro García Ruiz**, **“TRANSCRIPTIONAL PROFILE EVALUATION AND POTENTIAL NEURONAL SIGNALING PATHWAYS AFFECTED BY THE INHIBITION OF PRR12 BY iRNA”** thesis for Master in Science program, Autonomous University of Nuevo Leon, 2015.
<http://eprints.uanl.mx/9604/1/1080214977.pdf>
- Irving J. Lara-Navarro, Carlos Córdova-Fletes, **Alejandro García-Ruiz**, Horacio Rivera, **“A FURTHER INV DUP/DEL 9P DE NOVO REARRANGEMENT. REAPPRAISAL OF 25 INSTANCES”**, Gene Reports, 2015; 1:3-6.
- Bermudez-Reyes B, Lara-Banda M, Reyes-Zarate E, Rojas-Martínez A, Camacho A, Moncada-Saucedo N, Pérez-Silos V, **García-Ruiz A**, Guzmán-López A, Peña-Martínez V, Lara-Arias J, Torres-Méndez S, Fuentes-Mera L. **“EFFECT ON GROWTH AND OSTEOBLAST MINERALIZATION OF HYDROXYAPATITE-ZIRCONIA (HA-ZRO2) OBTAINED BY A NEW LOW TEMPERATURE SYSTEM”**. Biomedical Materials, 2017; 13(3):035001.
- Nidia K Moncada-Saucedo, Iván A Marino-Martínez, Jorge Lara-Arias, Víktor J Romero-Díaz, Alberto Camacho, Arcadio Valdés-Franco, Vanessa Pérez-Silos, **Alejandro García-Ruiz**, Hang Lin, Rocky Tuan, Rosalío Ramos-Payán, María del Refugio Lara-Banda, Rocío Ortiz-López, Augusto Rojas-Martínez and Lizeth Fuentes-Mera. **“A BIOACTIVE CARTILAGE GRAFT OF IGF1 TRANSDUCED ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS EMBEDDED IN A ALGINATE/BOVINE CARTILAGE MATRIX TRIDIMENSIONAL SCAFFOLD”**. Stem Cells International, 1–15, 2019.
- Vanessa Pérez-Silos, Nidia K Moncada-Saucedo, Víctor Peña-Martínez, Jorge Lara-Arias, Iván A Marino-Martínez, Alberto Camacho, Víktor J Romero-Díaz, María Lara Banda, **Alejandro García-Ruiz**, Adolfo Soto-Domínguez, Humberto Rodríguez-Rocha, Norberto López-Serna, Rocky S Tuan, Hang Lin, Lizeth Fuentes-Mera. **“A CELLULARIZED BIPHASIC IMPLANT BASED ON A BIOACTIVE SILK FIBROIN PROMOTES INTEGRATION AND TISSUE ORGANIZATION DURING OSTEOCHONDRAL DEFECT REPAIR IN A PORCINE MODEL”**. International journal of molecular sciences, 2019; 20(20):5145.
- **Alejandro García-Ruiz**, Celia N. Sánchez-Domínguez, Nidia K. Moncada-Saucedo, Vanessa Pérez-Silos, Jorge Lara-Arias, Iván A Marino-Martínez, Alberto Camacho, Víktor J. Romero-Díaz, Víctor Peña-Martínez, Rosalío Ramos-Payán, Rocky S. Tuan, Hang Lin, Lizeth Fuentes-Mera, Ana María Rivas-Estilla. **SEQUENTIAL GROWTH FACTORS EXPOSURE OF HUMAN AD-MSCS IMPROVES CHONDROGENIC DIFFERENTIATION IN AN OSTEOCHONDRAL BIPHASIC IMPLANT**. Experimental and therapeutic medicine. Under review.

AWARDS AND DISTINCTIONS

- Distinguished Master in Science postgraduate student by the School of Medicine and University Hospital “Dr. José Eleuterio González”, Autonomous University of Nuevo Leon. Mexico.
- Best Master in Science thesis of the Autonomous University of Nuevo Leon 2015.

CAPABILITIES

- **Language:**
Spanish and English.
 - **Informatic:**
Use of bioinformatic software tools for experimental and clinical analysis.
-